



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**PAPEL DO ZINCO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL:
DEFESAS ANTIOXIDANTES
E SINALIZAÇÃO CELULAR VIA PI3K/AKT**

CRISTINA FLORES BOROWSKI

FLORIANÓPOLIS, OUTUBRO DE 2006.

**PAPEL DO ZINCO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL:
DEFESAS ANTIOXIDANTES
E SINALIZAÇÃO CELULAR VIA PI3K/AKT**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina como
requisito parcial para obtenção de grau
de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Co-orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
FLORIANÓPOLIS, OUTUBRO DE 2006.

“Nossas limitações estão dentro das nossas mentes. Se conseguirmos ter essa percepção, não existirá limites, e seremos do tamanho dos nossos sonhos.”

AGRADECIMENTOS

Concluir o mestrado foi um grande desafio. Muitas pessoas dedicaram seu tempo e esforço, dando sua contribuição para me ajudar nesse processo. Esse período foi de grande aprendizado e crescimento, não só intelectual, mas pessoal. Essas pessoas a quem gostaria de agradecer contribuíram de várias formas pra esse crescimento. Portanto, agradeço...

A minha mãe, por todo o amor, conselhos e pela força nos momentos difíceis. Também por ter possibilitado a minha vinda pra Florianópolis sem bolsa de estudos. E aos meus irmãos pela amizade e pelo amor. Enfim, muito obrigada por tudo, de todo o meu coração. Amo vocês.

Ao Professor Alcir, meu co-orientador, gostaria de agradecer pela oportunidade, pela força, amizade, e pela grande ajuda que tornou possível a realização desta dissertação. Obrigada também pela orientação e por todos os ensinamentos no período em que trabalhamos juntos.

Ao Jeferson, que idealizou boa parte deste trabalho, e me ajudou muito com os experimentos. Obrigada, também, pela amizade e pela força.

Ao Professor Rodrigo Leal, meu orientador, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos e por toda a ajuda. Às meninas do lab, Thaís, Camila, Ana e Fernanda, obrigada pelo companheirismo e pela ajuda neste trabalho. Sem todos vocês, ele não seria possível. Ao Francesco, obrigada epla amizade e pela força. À Sara, obrigada pela força.

Aos Professores Carlos Alberto Gonçalves e Carmem Gottfried, pela amizade e pelo carinho. Ao pessoal do lab 33, agradeço pela amizade, pelo apoio, pelo carinho, enfim, foi um grande prazer ter conhecido e convivido com todos vocês.

Aos Professores Néelson, Carla, Ana Lúcia e Marcelo, com quem tive a oportunidade de conviver e aprender muito, seja nas disciplinas ou pelo convívio neste período.

Ao Professor Adair, por todos os conselhos e incentivo, pela amizade e pelo apoio.

Ao Secretário da Pós-Graduação Nivaldo, por todo o apoio e ajuda neste período.

À Maria Carmelita, pela preciosa ajuda nesse processo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Zinco nos Processos Biológicos	1
1.2. Zinco no Sistema Nervoso Central	2
1.3. Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO)	7
1.3.1. Defesas Celulares	10
1.3.1.1. Defesas Não Enzimáticas	11
1.3.1.2. Defesas Enzimáticas	12
1.4. Zinco e estresse oxidativo	17
1.5. Sinalização Celular	19
1.5.1. Proteínas Quinases	20
1.5.1.1. Akt como Elemento Regulatório Essencial	21
1.5.1.2. Papel de Radicais Livres e ERO na Sinalização Celular.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Animais	28
3.2. Tratamentos <i>in vivo</i>	28
3.2.1. Tratamento Agudo ou com Doses Repetidas de ZnCl ₂	28
3.3. Tratamentos <i>in vitro</i>	29

3.3.1. Tratamento das Fatias de Hipocampo.....	29
3.4. Avaliação da Viabilidade Celular.....	30
3.5. Parâmetros Antioxidantes.....	31
3.5.1. Avaliação da Atividade Glutathione Peroxidase (GPx)	31
3.5.2. Avaliação da Atividade Glutathione Redutase (GR)	32
3.5.3. Avaliação da Atividade Glutathione S-Transferase (GST).....	32
3.5.4. Avaliação da Atividade Catalase (CAT).....	33
3.5.5. Avaliação da Atividade γ -Glutamyl Transpeptidase (GGT)	33
3.5.6. Mensuração dos Níveis de GSH Total (GSH-t).....	34
3.6. Dosagem de Proteínas	34
3.7. Separação de Proteínas	35
3.8. Eletrotransferência e Imunodeteção	36
3.9. Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Estudos <i>in vivo</i>	38
4.1.1. Glutathione no hipocampo e no córtex de ratos jovens tratados com ZnCl ₂ de forma aguda.	38
4.1.2. Enzimas antioxidantes em hipocampo e córtex de ratos jovens tratados com ZnCl ₂ de forma aguda.	39
4.1.3. Glutathione no hipocampo e no córtex de ratos jovens tratados com doses repetidas de ZnCl ₂	41
4.1.4. Enzimas antioxidantes em hipocampo e em córtex de ratos jovens tratados com doses repetidas de ZnCl ₂	42
4.2. Estudos <i>in vitro</i> com fatias hipocâmpais de ratos jovens.....	45

4.2.1. Enzimas antioxidantes em fatias de hipocampo tratadas com diferentes concentrações de ZnCl_2 .	45
4.2.2. Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocampais expostas ao ZnCl_2 .	47
4.2.3. Efeito do pré-tratamento com ZnCl_2 sobre a inibição de viabilidade celular causada pelo peróxido de hidrogênio em fatias hipocampais.	48
4.2.4. Fosforilação da Akt em fatias hipocampais de ratos jovens tratadas com ZnCl_2 .	49
4.2.5. Ação do inibidor da PI3K (LY294002) sobre a fosforilação da Akt induzida pelo ZnCl_2 .	51
4.2.6. Ação do inibidor da PI3K (LY294002) sobre a viabilidade celular em fatias hipocampais expostas ao ZnCl_2 .	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

O zinco é um metal de transição presente nas sinapses, especialmente do córtex cerebral e hipocampo, onde desempenha um papel modulatório sobre diversas proteínas, incluindo enzimas e receptores. Neste trabalho foi realizado um estudo das ações do zinco *in vitro* (10-100 μ M; 2h) sobre a atividade de enzimas antioxidantes, sobre a viabilidade celular e sobre a modulação da via PI3K/AKT em fatias de hipocampo de ratos imaturos (14 dias de idade). Além disso, foram também avaliados os efeitos da administração *in vivo* do zinco sobre a atividade de enzimas antioxidantes em hipocampo e córtex cerebral de ratos jovens. Neste caso, foram utilizados tratamentos via intraperitoneal com $ZnCl_2$ seguindo dois protocolos: a) tratamento agudo de ratos com 13 dias de idade, através da administração de dose única de $ZnCl_2$ (1, 4 e 16 mg/Kg); b) tratamento com doses repetidas diárias de $ZnCl_2$ (1, 2 e 4 mg/Kg) por 5 dias no período pós-natal (PN) entre o 8º e 12º dia de idade. Os animais foram avaliados no 14º dia PN. Os resultados do estudo *in vivo* mostraram que não houve alteração nos níveis de glutathiona total (GSH-t) em nenhum dos tratamentos ou estruturas analisadas. Entretanto, nos dois modelos de tratamento, foi observado um aumento na atividade das enzimas glutathiona S-transferase (GST) e glutathiona peroxidase (GPx) no hipocampo, mas não no córtex cerebral. A atividade das enzimas glutathiona redutase (GR) e catalase não foram alteradas pelos diversos tratamentos com zinco e em nenhuma das estruturas analisadas. Nos estudos *in vitro* utilizando fatias hipocampais de ratos jovens todas as doses testadas de $ZnCl_2$ (10 a 100 μ M) produziram uma significativa e progressiva inibição da enzima GR, o que não aconteceu com as enzimas GST, GPx e γ -glutamyl-transpeptidase (GGT), sugerindo um efeito seletivo do metal sobre a enzima GR. A viabilidade celular foi analisada pela medida da redução do MTT. Os resultados mostraram que o $ZnCl_2$, nas concentrações mais elevadas (100-300 μ M), reduziu significativamente a viabilidade celular em fatias de hipocampo. Em função da inibição *in vitro* da enzima GR pelo zinco, responsável pela regeneração intracelular de glutathiona reduzida (GSH), foi analisado um possível efeito de sinergismo entre o $ZnCl_2$ e o agente pró-oxidante H_2O_2 . Os resultados mostraram que o pré-tratamento com zinco (10-100 μ M; 2h) não alterou a citotoxicidade (avaliada pelo MTT) produzida pelo H_2O_2 (1 mM). Este resultado sugere que a inibição da GR pelo zinco não está diretamente relacionada à toxicidade do H_2O_2 . O zinco 100 μ M, mas não 30 μ M, promoveu ativação significativa da AKT, observada através de um significativo aumento de fosforilação na Serina 473. O uso de LY294002, um inibidor de PI3K, enzima responsável pela ativação da AKT, inibiu a fosforilação no sítio 473, indicando que o efeito do zinco sobre AKT é dependente desta via.

ABSTRACT

Zinc is a transition metal found on synapses, specially in cerebral cortex and hippocampus, where it has a modulatory role upon several proteins, including enzymes and receptors. The present work was undertaken in order to investigate the effects of zinc *in vitro* (10-100 μ M; 2h) on antioxidant defense systems, on cell viability, and on modulation of PI3K/AKT pathway in hippocampal slices of young rats (14 days old). Additionally, we assess the actions of zinc *in vivo* on the activity of antioxidant defense systems in cerebral cortex and hippocampus of young rats. In this case, ZnCl₂ was administered intraperitoneally (i.p.) with the following two protocols: a) acute treatment was performed in 13 days old rats through the administration of a single dose of ZnCl₂ (1, 4 e 16 mg/Kg); b) repeated dosing was performed by the treatment with daily injections of ZnCl₂ (1, 2 e 4 mg/Kg) for 5 consecutive days in the postnatal period between 8th and 12th days old (PN8-12). The animals were analyzed on 14th post-natal day (PN14). The results showed that *in vivo* administration of zinc was unable of inducing changes total glutathione (GSH-t) levels in either treatments or structures analyzed. However, the results showed an increase of glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) activity on hippocampus, but not in cerebral cortex, in both treatments used. The glutathione reductase (GR) and catalase activity did not change in either *in vivo* treatments or structures analyzed. The study using hippocampal slices of young rats (PN14) exposed *in vitro* to ZnCl₂ (10-100 μ M) for 2 h, showed a significant and progressive inhibition of GR, with no changes in GST, GPx and gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT) activity, suggesting a specific *in vitro* effect of zinc upon GR. Cell viability was analyzed by measurement of cellular capacity to reduce MTT. The results showed that ZnCl₂ in the highest concentrations tested (100-300 μ M), decreased cell viability of hippocampal slices. Once zinc can inhibit GR *in vitro*, and this enzyme is responsible for intracellular regeneration of reduced glutathione (GSH), a possible synergistic effect between ZnCl₂ and H₂O₂ was analyzed. The results showed that pretreatment with ZnCl₂ (10-100 μ M; 2h) did not change the cytotoxicity (measured by MTT) produced by H₂O₂ (1 mM), suggesting that the inhibition of GR by zinc is not directly related to H₂O₂ toxicity. ZnCl₂ 100 μ M, but not 30 μ M, promoted activation of AKT, observed through a significant increase of the phosphorylation on Ser 473. The use of LY294002, a PI3K inhibitor, prevented this activation, indicating that the effect of ZnCl₂ on AKT is dependent of PI3K pathway.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Localização do zinco no cérebro de ratos.	2
Fig. 2. Transporte do zinco para o interior do cérebro.....	3
Fig. 3. Distribuição do zinco nas células nervosas.	4
Fig. 4. Transporte de zinco sináptico.....	5
Fig. 5. Alguns exemplos de espécies reativas de oxigênio.	7
Fig. 6. Redução univalente do oxigênio e formação de intermediários reativos.....	8
Fig. 7. Estresse oxidativo.	9
Fig. 8. Ciclo redox esquemático mostrando a relação entre enzimas antioxidantes e a glutathiona.....	11
Fig. 9. Alvos bioenergéticos potenciais para inibição pelo zinco.	18
Fig. 10. Diagrama esquemático do sistema de fosforilação de proteínas.	19
Fig. 11. Alvos da regulação da sobrevivência celular pela Akt.....	23
Fig. 12. Vias que podem ser mediadas por estresse oxidativo.	25
Fig. 13. Efeito do $ZnCl_2$ sobre os níveis de glutathiona total (GSH-t) em ratos jovens tratados com o metal de forma aguda.....	38
Fig. 14. Efeito do tratamento agudo com $ZnCl_2$ sobre a atividade das enzimas antioxidantes em hipocampo de ratos jovens.....	40
Fig. 15. Efeito do tratamento agudo com $ZnCl_2$ sobre a atividade de enzimas antioxidantes em córtex cerebral de ratos jovens.	41

Fig. 16. Efeito do ZnCl ₂ sobre os níveis de glutathiona total (GSH-t) em ratos jovens tratados com doses repetidas do metal.....	42
Fig. 17. Efeito do tratamento com doses repetidas com ZnCl ₂ sobre a atividade das enzimas antioxidantes em hipocampo de ratos jovens.	43
Fig. 18. Efeito do tratamento com doses repetidas com ZnCl ₂ sobre a atividade das enzimas antioxidantes em córtex cerebral de ratos jovens.	44
Fig. 19. Atividade de enzimas antioxidantes de fatias hipocampais em resposta ao tratamento <i>in vitro</i> com ZnCl ₂	46
Fig. 20. Efeitos do ZnCl ₂ sobre a viabilidade de fatias de hipocampos.	47
Fig. 21. Efeito do tratamento de zinco e H ₂ O ₂ na redução do MTT em hipocampo de ratos jovens.	49
Fig. 22. Efeito do ZnCl ₂ sobre a fosforilação da proteína Akt em fatias hipocampais de ratos jovens.	50
Fig. 23. Ação do inibidor de PI3K, LY294002, sobre a fosforilação de Akt em resposta ao tratamento <i>in vitro</i> com zinco.	52
Fig. 24. Ação do inibidor da PI3K/Akt, LY294002, sobre os efeitos do ZnCl ₂ na redução do MTT.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

ARE: elemento de resposta a antioxidantes

ATP: trifosfato de adenosina

BSA: albumina sérica bovina

CAT: catalase

CDNB: clorodinitrobenzeno

CFS: fluido cérebro espinhal

Cu/ZnSOD: cobre-zinco-superóxido dismutase

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECL: quimioluminescência

EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético

EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

ERO: espécies reativas de oxigênio

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

Fe-SOD: ferro-superóxido dismutase

G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase

GABA: ácido γ -aminobutírico

GCL: γ -glutamil-cisteína sintetase ou glutamato-cisteína ligase

GMPC: monofosfato de guanosina cíclico

GPx: glutathione peroxidase

GR: glutathione reductase

GSH: γ -glutamil-cisteinil-glicina ou glutathione

GSH-t: glutathione total

GSSG: dissulfeto de glutathione

GST: glutationa S-transferase
 HEPES: ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
 JNK: quinase c-Jun NH₂-terminal
 MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos
 MDA: malonildialdeído
 Mn-SOD: manganês- superóxido dismutase
 MTT: brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2,5-difenil-tetrazolium)
 NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
 NFκB: fator de transcrição nuclear kappa B
 NMDA: *N*-Methyl-*D*-Aspartato
 NrF2: fator nuclear relacionado ao fator E2
 p38^{MAPK}: proteína quinase ativada por mitógeno de 38 kDa
 PCA: ácido perclórico
 PH: domínio de homologia à plestrina N-terminal
 PI3K: fosfoinositol 3-quinase
 PIP₂: fosfatidilinositol 3,4-bifosfato
 PIP₃: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
 PI(4,5)P₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
 PKB: proteína quinase B
 PKC: proteína quinase C
 RNA: ácido ribonucleico
 RNAm: ácido ribonucleico mensageiro
 RTK: receptor tirosina quinase
 SDS: dodecil sulfato de sódio
 SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
 SNC: sistema nervoso central
 SOD: superóxido dismutase
 TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
 t-BOOH: hidroperóxido de tert-butila
 TBS: tampão tris-salina
 TBS-T: tampão tris-salina com Tween-20

TCA: ácido tricarbólico

TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletenodiamina

TGF β : fator de crescimento tumoral β

1. INTRODUÇÃO

1.1. Zinco nos Processos Biológicos

O zinco (Zn^{2+}) é um metal de transição que modula a função de diversas proteínas regulatórias associadas a uma variedade de atividades celulares (Eom *et al.*, 2001). Nas células de mamíferos, o zinco é o micronutriente essencial mais abundante depois do ferro. Aproximadamente 300 enzimas diferentes requerem zinco, incluindo DNA e RNA polimerases, metaloproteinases e enzimas do metabolismo intermediário, como piruvato carboxilase e lactato desidrogenase (Tapiero & Tew, 2003; Vallee & Auld, 1996; Vallee & Falchuk, 1986). Fisiologicamente, em baixas concentrações, o zinco contribui para importantes processos biológicos, incluindo expressão gênica, síntese de DNA, catálise enzimática, sinalização celular e neurotransmissão (Frederickson *et al.*, 2000). Por outro lado, o excesso de zinco livre nos tecidos do corpo pode ser tóxico (Choi & Koh, 1998).

O crescimento e a diferenciação de células eucarióticas geralmente são induzidos por hormônios e fatores de crescimento que acionam elementos que estão envolvidos em cascatas intracelulares de sinalização, envolvendo receptores, mensageiros intracelulares, proteínas cinases, proteínas fosfatases e fatores de transcrição (Lau & Haganir, 2006). O zinco está envolvido em diversos pontos nas vias de transdução de sinal, podendo ser um componente estrutural ou modulador da atividade de enzimas, proteínas regulatórias e fatores de transcrição (Vallee & Falchuk, 1993; Beyersmann & Haase, 2001). Entretanto, perturbação na homeostase do Zn^{2+} intracelular pode, em determinadas situações, ser letal

para as células (Koh & Choi, 1994; Manev *et al.*, 1997; Lobner *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2000).

1.2. Zinco no Sistema Nervoso Central

Similar a outros compostos endógenos, o zinco pode ser tanto um neuromodulador essencial quanto uma potente neurotoxina, dependendo da sua concentração intracelular (Baranano *et al.*, 2001). Baixos níveis de zinco possuem uma ação anticonvulsivante e neuroprotetora, enquanto altas concentrações de zinco podem matar neurônios e induzir atividade epilética (Frederickson & Moncrieff, 1994).

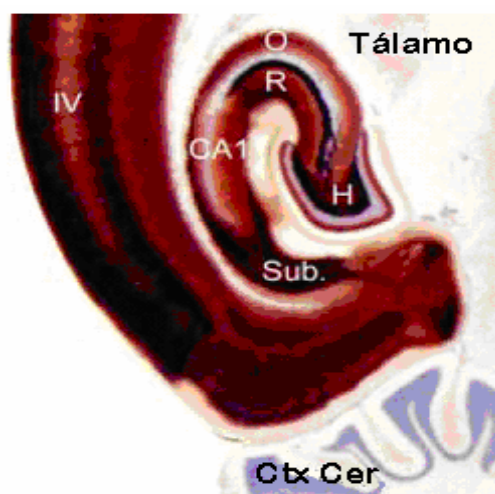


Fig. 1. Localização do zinco no cérebro de ratos. Quadrante caudal esquerdo do cérebro de rato (secção horizontal) mostra o zinco vesicular na coloração marrom-escura a preta, a partir da coloração para zinco vesicular pelo método de Danscher. A quarta camada do isocórtex e o hipocampo se mostram bem coradas para o zinco vesicular. A maioria das regiões corticais cerebrais é fortemente inervada por terminais que contêm zinco, enquanto o córtex cerebelar (Ctx Cer) e o tálamo não estão corados para o zinco vesicular. A quarta camada do isocórtex (IV), as regiões CA1, hilo do giro denteado (H), estrato oriens (O), estrato radiato (R) e córtex subicular (Sub), todas pertencendo ao hipocampo, se mostram bem coradas para o zinco vesicular (Frederickson *et al.*, 2004).

O zinco é um nutriente essencial para as funções neurológicas normais. Dentre os tecidos, o cérebro possui o maior conteúdo de zinco, apresentando concentrações cerca de dez vezes maiores que o plasma (cerca de 100 – 150 μM) (Mocchegiani *et al.*, 2005). Apesar de neurônios que contêm zinco serem encontrados em várias regiões do cérebro, incluindo neocórtex, amígdala e bulbo olfatório, os neurônios do hipocampo (Fig.1) têm a maior concentração de zinco e são particularmente vulneráveis ao dano celular mediado pelo íon (Haug, 1967; Perez-Clausell & Danscher, 1985; Frederickson, 1989; Frederickson *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001a). No sistema límbico, o zinco regula tanto a transmissão sináptica inibitória quanto excitatória no hipocampo. Além disso, o zinco pode ter um importante papel na formação da memória (Takeda, 2000).

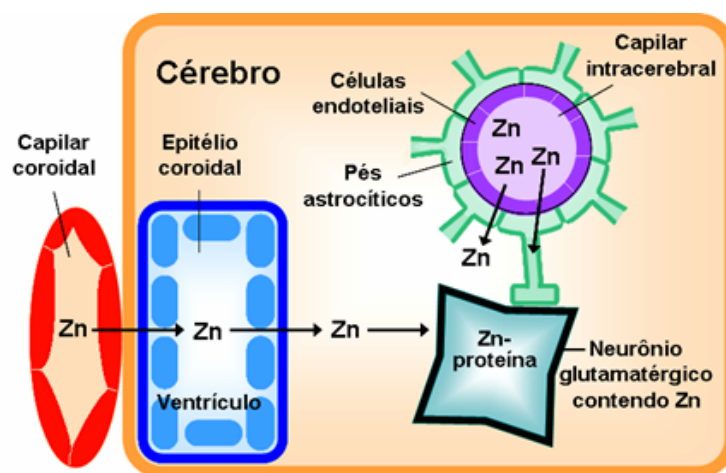


Fig. 2. Transporte do zinco para o interior do cérebro. A albumina e os aminoácidos histidina e cisteína ligados ao zinco são fontes deste metal no plasma. O zinco pode atravessar a barreira hematoencefálica e a barreira hemato-fluidocérebroespinhal. No interior do cérebro, pode se ligar a metaloproteínas ou ser incorporado a vesículas sinápticas em neurônios glutamatérgicos (modificado a partir de Takeda, 2004).

O transporte de metais-traço para dentro do cérebro é rigorosamente regulado pelas barreiras hemato-fluidocérebroespinhal e hematoencefálica (Fig. 2). O zinco atravessa a

barreira hematoencefálica ligado à albumina, ou a aminoácidos como histidina e cisteína (Takeda, 2000). No cérebro, em condições normais, 90% do zinco se encontra ligado a proteínas, como metalotioneínas (Cole *et al.*, 1999). O restante, cerca de 10%, será sequestrado nas vesículas sinápticas de neurônios que contêm zinco, e posteriormente liberado dos terminais neuronais (Crawford & Connor, 1973; Frederickson *et al.*, 2004; Takeda, 2004) (Fig.3).

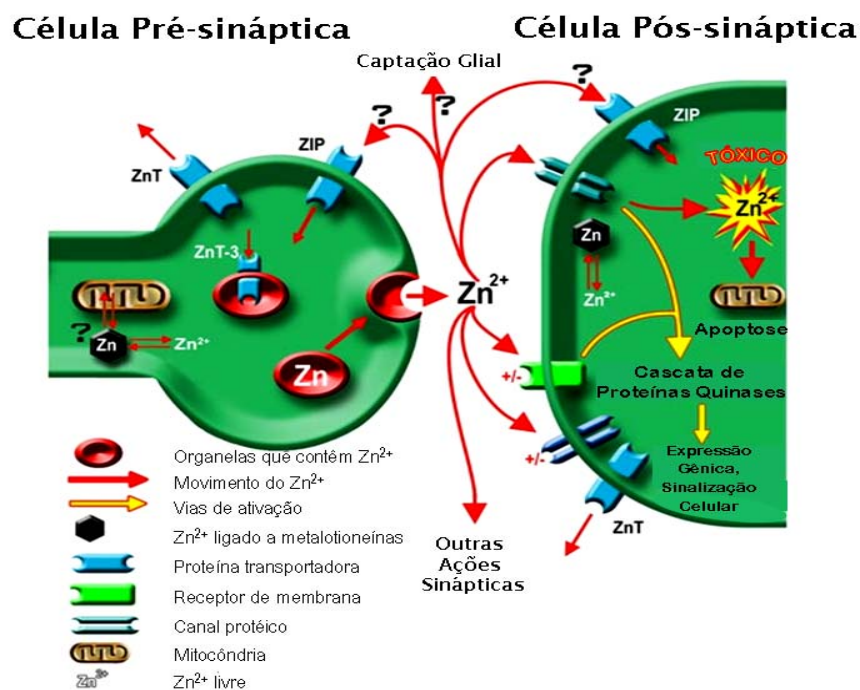


Fig. 3. Distribuição do zinco nas células nervosas. O zinco pode ser encontrado ligado à metaloproteínas ou no interior de vesículas sinápticas. O transporte do zinco é feito pelas proteínas transportadoras ZnT e ZIP. Uma vez liberado na fenda sináptica, o zinco pode se ligar a receptores de membrana ou entrar no neurônio pós-sináptico, através de canais protéicos ou pela ação de transportadores, acionando cascatas de proteínas quinases que, através da sinalização celular, podem induzir a expressão gênica. Em altas concentrações, o zinco pode levar o neurônio à apoptose. (Adaptado de Colvin *et al.*, 2003).

A captação de zinco nas células neuronais ocorre ao nível de corpo celular, bem como pelo terminal neuronal. Como os terminais pré-sinápticos liberam zinco, e o corpo

celular e os dendritos do neurônio pós-sináptico possuem canais permeáveis ao zinco, sob condições favoráveis, o zinco poderá translocar do interior do neurônio pré-sináptico para o interior do neurônio pós-sináptico. Durante atividade neuronal intensa pode se esperar uma intensificação desta translocação (Atar *et al.*, 1995; Yin *et al.*, 1998; Sensi *et al.*, 2000; Kerchner *et al.*, 2000).

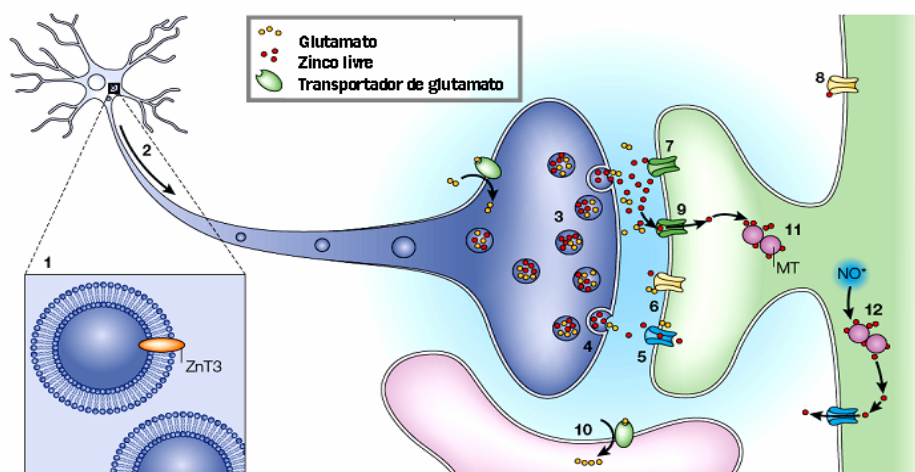


Fig. 4. Transporte de zinco sináptico. Vesículas com a proteína transportadora de zinco vesicular, ZnT3 (1), reunidas no Aparelho de Golgi de neurônios glutamatérgicos que contêm zinco, são transportadas pelo axônio (2). Uma vez no terminal pré-sináptico, essas vesículas podem ser vistas contendo tanto zinco livre quanto glutamato (3). O zinco e o glutamato são liberados por exocitose dependente de cálcio e impulso nervoso (4). Na fenda sináptica o zinco modula uma variedade de canais transportadores e receptores (5-10) em neurônios e células gliais. Os canais de cálcio possuem certa permeabilidade ao zinco (5 e 9), permitindo sua entrada na célula pós-sináptica, onde ele é ligado às metalotioneínas (MT) (11). Oxidação e nitrosilação de tióis das metalotioneínas pelo óxido nítrico (NO) promovem a liberação somática do zinco (12) (Frederickson *et al.*, 2005).

A liberação de zinco na sinapse juntamente com o neurotransmissor glutamato tem sido bem documentada (Fig. 4), e o termo “gluzinérgico” tem sido proposto para descrever esse tipo de neurônios (Frederickson, 1989; Frederickson & Bush, 2001). Durante atividades fisiológicas, incluindo memória e aprendizado, as fibras musgosas do hipocampo

podem transmitir informação aos neurônios desta estrutura em frequências excepcionalmente altas. Durante esses períodos, o zinco liberado sinapticamente pode agir de forma a proteger os neurônios contra os potenciais de ação excitotóxicos consequentes da transmissão glutamatérgica aumentada através da inibição dos receptores *N*-Metil-*D*-Aspartato (NMDA) via um sítio de ligação de alta afinidade (Paoletti *et al.*, 1997). A concentração de zinco nas vesículas glutamatérgicas é de aproximadamente 300-350 μM (Perez-Clausell & Dansher, 1985; Takeda, 2000). Durante a atividade neuronal, é estimado que o zinco atinja um pico de concentração sináptica de 10-100 μM (Vogt *et al.*, 2000), podendo chegar a níveis ainda maiores após uma atividade sináptica aumentada (Assaf & Chung, 1984; Howell *et al.*, 1984; Molnar & Nadler, 2001).

Durante estímulo normal, o zinco liberado dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos pode ser translocado para a célula pós-sináptica através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem ou dos receptores AMPA/cainato, podendo acionar cascatas de sinalização neste neurônio (Sensi *et al.*, 1999a). Há evidências de que tal translocação contribui para a injúria celular induzida pelo zinco na excitotoxicidade (Li *et al.*, 2001b). Assim, apesar dos importantes papéis neuromodulatórios do zinco livre, a liberação excessiva deste metal nos botões sinápticos pode resultar em morte neuronal pós-sináptica (Frederickson, 1989; Frederickson *et al.*, 1989; Koh *et al.*, 1996; Ahn *et al.*, 1998). Portanto, os estudos que investigam os mecanismos de neurotoxicidade do zinco têm focado, principalmente, sua interação com o sistema glutamatérgico.

Considerando os aspectos relacionados à neurotoxicidade do zinco, tem sido indicado que a excessiva liberação pré-sináptica do metal pode contribuir ou participar de eventos bioquímicos relacionados à neurodegeneração após isquemia global transitória e trauma cerebral (Aniksztejn *et al.*, 1987; Suh *et al.*, 2000; Weiss e Sensi, 2000; Koh, 2001).

Além disso, tem sido proposto que o aumento nos níveis intracelulares de zinco após um evento de estresse, pode também se originar de compartimentos dos próprios neurônios pós-sinápticos, como estoques mitocondriais e zinco ligado a metalotioneínas (Frederickson *et al.*, 2004).

1.3. Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO)

Radicaís livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo (Marks *et al.*, 1996) e podem ser tanto moléculas orgânicas, tais como quinonas, ou inorgânicas como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). São altamente reativos e, portanto, com tempo de vida muito curto. São formados durante o metabolismo celular normal e, também, quando o organismo é exposto a uma série de estímulos como radiação ionizante e biotransformação de xenobióticos (Comporti, 1989).

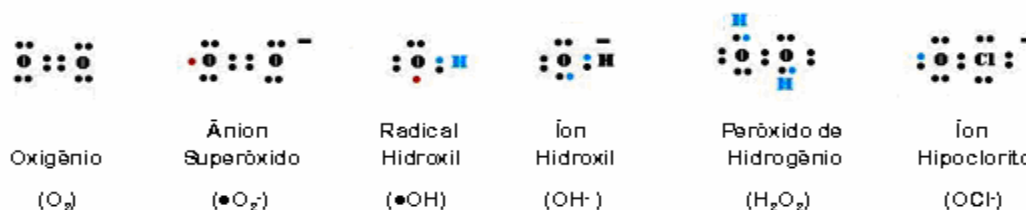


Fig. 5. Alguns exemplos de espécies reativas de oxigênio.

Fonte: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/ROS.html> Acessado em Julho de 2006.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são compostos contendo oxigênio (Fig. 5). ERO incluem os radicais livres como o ânion superóxido, ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), radicais hidropéroxil (HO_2^{\cdot}), e as espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlet (O_2^{\uparrow}) (Halliwell & Gutteridge, 1999). Estas espécies são altamente reativas e podem agir como sinalizadores celulares, ou ainda como causadores de

dano ao DNA, ativadores pró-carcinógenos, e podem alterar o sistema de defesa antioxidante celular (Comporti, 1989; Cerutti, 1994; Liochev e Fridovich, 1999).

O oxigênio molecular, em seu estado fundamental, é um bi-radical contendo dois elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo. Entretanto, estes dois elétrons desemparelhados apresentam “spins” de mesma orientação, tornando o O₂ uma molécula pouco reativa, podendo reagir com apenas um elétron por vez. O O₂ é capaz de aceitar quatro elétrons, o que o reduz à água. Entretanto, reduções parciais do O₂ conduzem ao aparecimento de diversas espécies reativas (Fig 6).

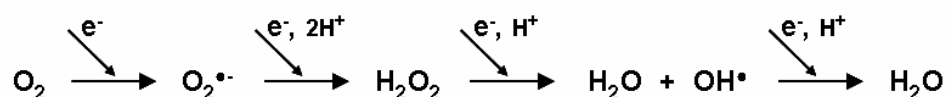


Fig. 6. Redução univalente do oxigênio e formação de intermediários reativos. Os quatro passos para a redução de O₂ geram, progressivamente, superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e água (modificado a partir de Marks *et al.*, 1996).

Quando o O₂ aceita um elétron, é formado o ânion superóxido, considerado um radical por possuir um elétron desemparelhado. Essa reação não é termodinamicamente favorável e requer um agente fortemente redutor como, por exemplo, a CoQ na cadeia transportadora de elétrons. Quando o superóxido recebe um elétron, é reduzido a peróxido de hidrogênio, que não é um radical, mas pode gerar o radical hidroxila em consequência de uma nova redução. Finalmente, em um último passo, a entrada de mais um elétron reduz o radical hidroxila à água (Marks *et al.*, 1996).

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas, existe uma produção constante de radicais livres e ERO acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de

antioxidantes, de modo a manter a integridade celular estrutural e funcional. A condição de estresse oxidativo foi definida como um distúrbio no balanço pró-oxidante e antioxidante (Fig.7), em favor do primeiro, podendo causar danos celulares (Sies, 1997; Ho *et al.*, 1998). Desta forma, o estresse oxidativo pode resultar: (1) da maior geração de ERO, (2) da defesa insuficiente das enzimas antioxidantes, (3) da liberação de metais de transição, potenciais geradores do radical hidroxila, (4) da combinação destes fatores (Halliwell, 2001).

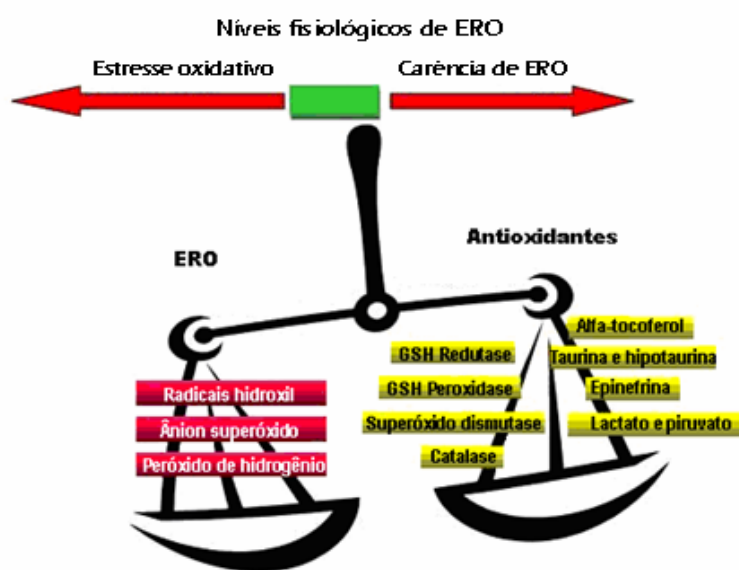


Fig. 7. Estresse oxidativo. Estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres excede a taxa de sua remoção pelos mecanismos de defesa antioxidantes. Fonte: <http://www.asiaandro.com/1008-682x/6/59htm>. Acessado em Julho de 2006.

Os danos causados pelo estresse oxidativo incluem, principalmente, clivagem do DNA pela hidroxilação da guanina e metilação da citosina (Lee *et al.*, 2002), lise mitocondrial, influxo de cálcio, oxidação de proteínas, gerando derivados carbonil e nitrotirosina (Adams *et al.*, 2001), e peroxidação de lipídios da membrana celular (Marks *et al.*, 1996). Os organismos aeróbicos desenvolveram, portanto, diferentes mecanismos de

defesa antioxidante, enzimáticos e não-enzimáticos, que podem prevenir a formação das ERO, reagir com estes intermediários reativos, bem como reparar os danos causados pelos mesmos (Sies, 1993).

O cérebro é particularmente sensível aos danos causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) devido a sua alta taxa metabólica e sua capacidade relativamente reduzida de regeneração celular comparada com outros órgãos (Andersen, 2004). Além disso, os tecidos cerebrais contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, que podem ser oxidados por radicais livres. Finalmente, o cérebro contém altos níveis de ferro, o qual tem sido referido como importante elemento associado à produção de radicais livres e injúria neural (Herbert *et al.*, 1994).

1.3.1. Defesas Celulares

O organismo possui defesas antioxidantes que o protegem dos danos oxidativos. Estas defesas podem ser definidas como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste” (Halliwell e Gutteridge, 1999). Estas defesas podem ser fornecidas por compostos não enzimáticos assim como por enzimas específicas (Halliwell, 2001). Os antioxidantes protegem as células do dano oxidativo (Halliwell, 1992; Sies, 1996). Portanto, frente a um estresse oxidativo, estas defesas são acionadas para restabelecer o equilíbrio, evitando o dano oxidativo.

1.3.1.1. Defesas Não Enzimáticas

Existem várias moléculas que podem agir como antioxidantes não enzimáticos, entre elas podemos citar: os tocoferóis, o ácido ascórbico, assim como os carotenóides e a glutathiona (GSH) (Sies *et al.*, 1992).

A GSH é um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteinil-glicina), sendo considerada o antioxidante endógeno universal devido a sua importância na proteção celular contra a formação de ERO, na homeostase tiólica, na manutenção da homeostase redox da célula, e na defesa contra agentes eletrofilicos (Cooper, 1997; Dringen, 2000; Bharath *et al.*, 2002).

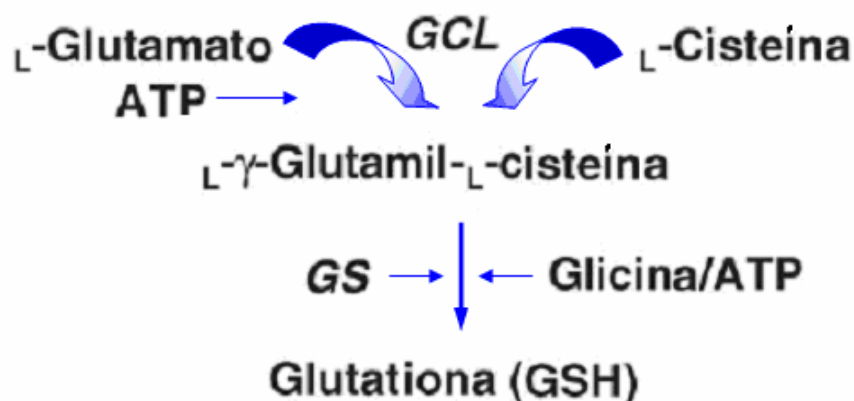


Fig. 8. Ciclo redox esquemático mostrando a relação entre enzimas antioxidantes e a glutathiona. A glutathiona é sintetizada em duas reações enzimáticas sequenciais dependentes de ATP. O primeiro passo da síntese da glutathiona (GSH) é sintetizado pela γ -glutamyl-cisteína sintetase ou glutamato-cisteína ligase (GCL), a qual liga os aminoácidos L-glutamato e L-cisteína. A enzima glutathione sintetase (GS) liga L- γ -glutamato-L-cisteína com o aminoácido glicina para formar L- γ -glutamyl-L-cisteinil-glicina (GSH). Modificado a partir de Haddad & Harb, 2005.

A GSH é utilizada por uma série de enzimas, como a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione S-transferase (GST). A GSH é sintetizada em dois passos, por duas enzimas distintas: γ -glutamyl-cisteína sintetase ou glutamato-cisteína ligase (GCL), que é

considerada o ponto regulatório da produção da GSH, e pela glutathione sintetase, que é responsável pela adição de glicina (Sies, 1999) (Fig. 8). O termo glutathione total (GSH-t) é usado para a soma do dissulfeto da glutathione (GSSG) com sua forma tiólica (GSH).

Os grupos tióis contidos na glutathione podem ser oxidados enzimaticamente, levando à formação de pontes dissulfeto (-S-S-). Por outro lado, as pontes dissulfeto são facilmente reduzidas, formando novamente os grupos tióis. Desta forma, a taxa de redução e oxidação dos grupos tióis pode ser o principal fator determinante do potencial de redução celular (Galaris & Evangelou, 2002). A razão entre a GSH reduzida e a oxidada (GSH/GSSG) varia entre os vários compartimentos celulares, variando de 2:1 no retículo endoplasmático a mais de 100:1 em outros compartimentos (Hwang *et al.*, 1992). O balanço entre a GSH reduzida e a oxidada representa um fator chave no estado redox celular (Meister, 1994).

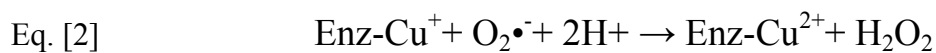
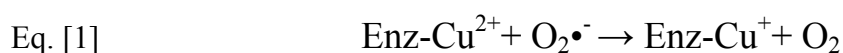
Foi demonstrado que neurônios em cultura são mais vulneráveis à compostos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxido de tert-butila (t-BOOH), ou peroxinitrito ($ONOO^-$) (Ben-Yoseph *et al.*, 1994; Bolaños *et al.*, 1995; Abe & Saito, 1998). Isso provavelmente ocorre porque neurônios em cultura contêm glutathione em uma concentração mais baixa do que células astrogiais em cultura (Raps *et al.*, 1989; Bolaños *et al.*, 1995).

1.3.1.2. Defesas Enzimáticas

As principais enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathione S-transferase (GST) e γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT).

a) Superóxido Dismutase (SOD)

A enzima SOD catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (McCord e Fridovich, 1969), conforme representado na equação [1] e [2]. Esta enzima é encontrada em diferentes isoformas. A cobre-zinco-SOD (Cu/Zn-SOD) é uma metaloproteína dimérica que possui em cada subunidade um sítio ativo com um átomo de cobre e um átomo de zinco. É encontrada no citoplasma e núcleo das células de mamíferos (Halliwell e Gutteridge, 1999).



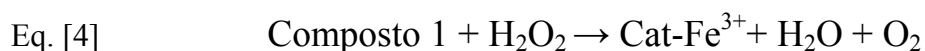
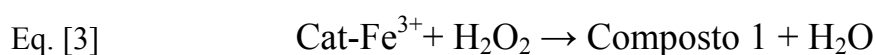
Outras isoenzimas SOD foram identificadas. A enzima manganês-SOD (Mn-SOD) possui manganês no sítio catalítico. Nas células humanas, a Mn-SOD é encontrada principalmente na matriz mitocondrial (Halliwell & Gutteridge, 1999). A enzima extracelular-SOD (EC-SOD) é encontrada na superfície celular, em quantidades muito pequenas na maioria dos tecidos se comparada às isoformas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD (Marklund, 1984; Oury *et al.*, 1996). Embora os níveis de EC-SOD no cérebro sejam baixos, existem regiões específicas, como o hipocampo, nas quais a presença da enzima EC-SOD é necessária para as funções normais de aprendizado e memória (Levin *et al.*, 1998). A isoforma ferro-SOD (Fe-SOD), que possui ferro no sítio catalítico, não é encontrada nas células de mamíferos (Wandres & Denis, 1992).

b) Catalase (CAT)

A maioria das células aeróbicas possui atividade catalásica. A localização intracelular da catalase é basicamente peroxissomal. Nos animais, a CAT está presente em

todos os principais órgãos do corpo, especialmente no fígado e nos eritrócitos (Halliwell & Gutteridge, 1999). No sistema nervoso central, a catalase é encontrada nos quatro principais tipos celulares, sendo eles astrócitos, neurônios, oligodendrócitos e microglia (Dringen *et al.*, 2005).

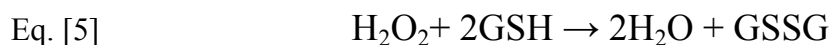
A CAT decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Farber *et al.*, 1990), conforme as equações abaixo:



c) Glutathione Peroxidase (GPx)

No cérebro, a enzima GPx é encontrada em astrócitos, neurônios, microglia e oligodendrócitos (Dringen *et al.*, 2005). Esta enzima está presente principalmente na matriz mitocondrial, no citoplasma e no núcleo das células (Halliwell & Gutteridge, 1999). A isoforma citosólica de GPx, GPx1, parece ser muito importante para o sistema de defesa antioxidativo do cérebro (Zhang *et al.*, 2000; Crack *et al.*, 2001; Flentjar *et al.*, 2002).

A GPx possui atividade peroxidase, utilizando doadores de elétrons para reduzir o peróxido de hidrogênio à água (Little & O'Brien, 1968) conforme as equações abaixo:



A GPx possui selênio no sítio catalítico e utiliza o tripeptídeo tiólico GSH como doador de elétrons para a redução do H_2O_2 (Eq. [5]) e de outros peróxidos orgânicos

(LOOH, Eq. [6]), tais como os lipoperóxidos provenientes da lipoperoxidação lipídica, impedindo assim a fase de propagação deste processo (Keeling & Smith, 1982). Durante o processo catalisado pela GPx ocorre a oxidação da GSH, e conseqüente formação de uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de glutathione (GSSG), com concomitante formação do álcool (LOH) derivado do peróxido orgânico.

d) Glutathione Redutase (GR)

A importância da enzima GR consiste em manter o equilíbrio GSH/GSSG na célula, pois a GSH é uma molécula que tem como função essencial manter as células no seu estado reduzido. Portanto, ela atua como um agente antioxidante, reduzindo peróxidos através da ação da glutathione peroxidase (Meister, 1983; Stamler, 1994; Fujii *et al.*, 2000). No sistema nervoso central, assim como a GPx, a GR é encontrada em astrócitos, neurônios, microglia e oligodendrócitos (Dringen *et al.*, 2005).

A GR contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons que catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG) em glutathione reduzida (GSH) de forma dependente de NADPH (Voet *et al.*, 2000), conforme equação abaixo:



e) Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH)

A enzima G6PDH está presente no citoplasma de todas as células. Ela faz parte do ciclo das pentoses e participa da produção de NADPH, uma molécula necessária em vários processos de biossíntese e, também, na manutenção da atividade da glutathione redutase. A

G6PDH catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconolactona, hidrolisada em 6-fosfogliconato. No processo catalítico, esta enzima utiliza NADP^+ como aceptor de elétrons, gerando equivalentes reduzidos de NADPH que mantém parte do poder redutor intracelular (Voet *et al.*, 2000).

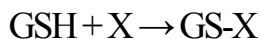


f) Glutathione S-Transferase (GST)

GST constitui uma família de enzimas multifuncionais envolvidas na detoxificação metabólica de agentes eletrofílicos incluindo agentes alquilantes, herbicidas, pesticidas e outros xenobióticos (Ketterer *et al.*, 1988; Mannervik & Danielson, 1988; Vos & Van Bladeren, 1990). GST possui diferentes isoformas, presentes na maioria dos órgãos de mamíferos. São proteínas diméricas consistindo de duas subunidades pertencentes à mesma classe, que pode ser α , μ , π , e θ (Mannervik & Danielson, 1988; Meyer *et al.*, 1991). No cérebro de ratos, GST está presente em neurônios, astrócitos, células endoteliais e oligodendrócitos. Além disso, há diferenças regionais no padrão de expressão das classes α , μ , π de GST (Johnson *et al.*, 1993).

A catálise de GST propicia a conjugação destes agentes eletrofílicos com o grupo -SH da GSH [Eq. 9], tornando os compostos mais hidrofílicos, facilitando sua metabolização e excreção (Ketterer *et al.*, 1983). GST apresenta também atividade glutathione peroxidase [Eq. 6] independentemente de selênio, podendo reduzir peróxidos orgânicos (Mosialou *et al.*, 1993).

Eq. [9]



g) γ -Glutamyl Transpeptidase (γ -GT)

γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT ou GGT) é uma enzima glicoprotéica ligada à superfície da membrana celular, onde catalisa a transferência do grupo γ -glutamyl da GSH nas suas formas reduzida e oxidada por hidrólise de uma ligação γ -glutamyl para outros aminoácidos aceptores, peptídeos ou água, (Meister *et al.*, 1981). No final da reação catalisada por GGT são formados aminoácidos γ -glutamyl (ou peptídeos γ -glutamyl) e o dipeptídeo CysGly.

No sistema nervoso central de ratos adultos, a GGT está principalmente localizada nos pés astrocíticos perivasculares que circundam os vasos sanguíneos, e em alguns pericitos (Zhang *et al.*, 1997; Cambier *et al.*, 2000).

1.4. Zinco e estresse oxidativo

Tanto o excesso quanto a deficiência de zinco podem levar ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, ativar ou inibir fatores de transcrição sensíveis à oxidação, podendo afetar a função, a proliferação e a sobrevivência celular (Oteiza *et al.*, 2004). Embora o zinco não seja ele próprio um oxidante, este metal pode inibir a produção da energia celular através de mecanismos que aumentam o estresse oxidativo (Fig. 9) (Dineley *et al.*, 2003). Alguns estudos evidenciam que o estresse oxidativo pode ser o principal causador de morte neuronal pelo zinco (Kim *et al.*, 1999b; Noh *et al.*, 1999; Noh & Koh, 2000).

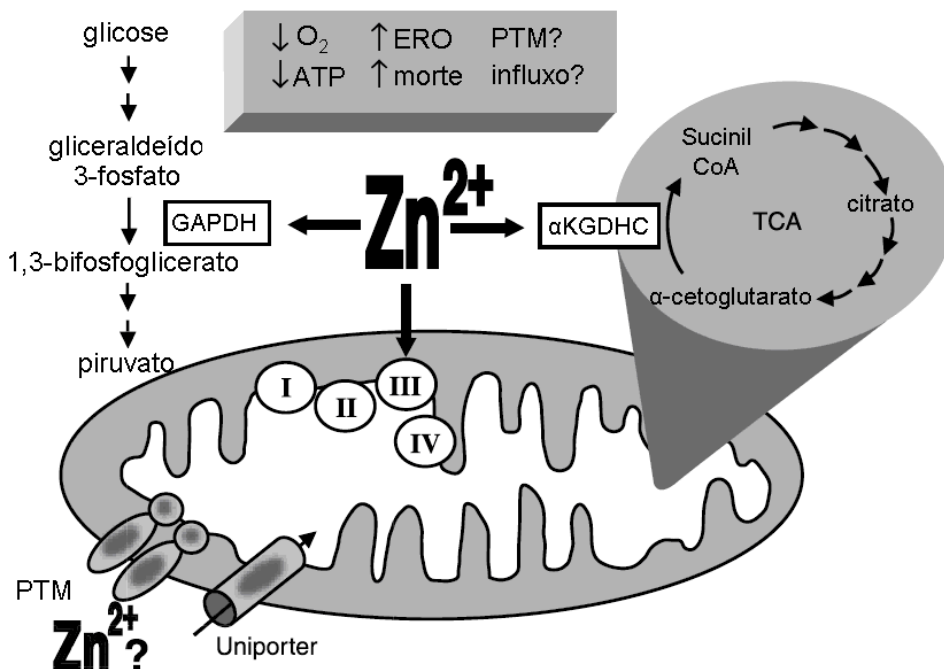


Fig. 9. Alvos bioenergéticos potenciais para inibição pelo zinco. O zinco pode comprometer a produção de energia celular através da inibição da glicólise pela inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), da inibição do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) pela inibição do complexo α -cetoglutarato desidrogenase (KGDHC), e da inibição da cadeia transportadora de elétrons. Possíveis consequências do aumento da concentração de zinco intracelular incluem consumo reduzido de O₂, níveis de ATP reduzidos, aumento na geração de ERO, permeabilidade mitocondrial transitória (PTM), e morte neuronal. O impacto do zinco na permeabilidade mitocondrial, bem como os mecanismos responsáveis pela captação de zinco pela mitocôndria permanecem obscuros (modificado a partir de Dineley *et al.*, 2003).

Um aumento no zinco intracelular pode causar disfunção mitocondrial, o que pode levar à geração de espécies reativas de oxigênio (Sensi *et al.*, 1999b). A inibição do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) pelo zinco poderia estimular a produção de ERO através da inibição do complexo da α -cetoglutarato desidrogenase (Gazaryan *et al.* 2002). Além disso, um aumento nos níveis de zinco intracelular causa a inibição da atividade da GR *in vitro* (Mize & Langdon, 1962), e aumenta a geração de ânion superóxido pela enzima NADPH oxidase (Noh & Koh, 2000), resultando em elevada produção de ERO. Por fim, tem sido sugerido que o zinco também pode contribuir na patobioquímica de desordens

neurodegenerativas, tais como Mal de Parkinson, algumas formas de Esclerose Lateral Amiotrófica, e Mal de Alzheimer (Cuajungco & Lees, 1997; Puttaparthi *et al.*, 2002; Friedlich *et al.*, 2004).

1.5. Sinalização Celular

Nos organismos multicelulares, as células necessitam utilizar vias de sinalização para comunicar-se entre si e para comandar diversas funções relacionadas, entre outras, à migração, proliferação, diferenciação e morte (Davis, 2000). Neste processo, a fosforilação de proteínas representa uma via comum e de fundamental importância.

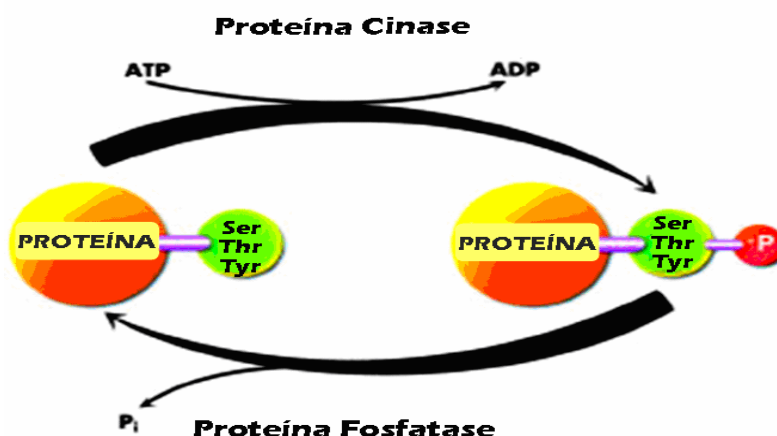


Fig. 10. Diagrama esquemático do sistema de fosforilação de proteínas. As proteínas cinases catalisam a transferência de γ -fosfato (P) do ATP a resíduos de serina (Ser), treonina (Thr), ou tirosina (Tyr) presentes nas proteínas substratos. As proteínas fosfatases catalisam a hidrólise da ligação fosfoéster, causando a liberação do fosfato inorgânico (P_i). Fonte: modificado a partir de <http://www.emdbiosciences.com>. Acessado em Julho de 2006.

Sinais extracelulares, dentro ou fora do SNC, são conhecidos por produzir muitos de seus efeitos fisiológicos através da regulação do estado de fosforilação de proteínas

específicas em suas células-alvo (Robinson & Cobb, 1997; Hunter, 2000; Greengard, 2001). Um sistema de fosforilação de proteínas consiste de: uma proteína cinase, uma proteína fosfatase, um substrato protéico e ATP (Fig. 10).

1.5.1. Proteínas Cinases

Proteínas cinases são classificadas como proteínas serina/treonina ou tirosina cinases porque são capazes de fosforilar substratos protéicos em resíduos de serina/treonina ou tirosina. As proteínas cinases catalisam a transferência de um grupo fosfato γ do ATP para o grupo hidroxila no respectivo resíduo de aminoácido em seu substrato protéico (Fig. 10) (Nestler & Greengard, 1999).

A fosforilação de proteínas realiza um papel fundamental na regulação de diversas funções celulares, sendo o principal mecanismo acionado no processo de transdução de sinal em resposta a diversos sinais extracelulares (Hunter, 1995; Pawson & Scott, 1997; Lau & Haganir, 1999; Nestler & Greengard, 1999; Schillace & Scott, 1999; Hunter, 2000; Lau & Haganir, 2006). A fosforilação de uma proteína altera sua carga e, por consequência, sua conformação de forma reversível. Esse mecanismo regula a atividade funcional de diversas proteínas, desencadeando respostas biológicas específicas. Dessa forma, a fosforilação/defosforilação de proteínas pode regular importantes processos biológicos, como a atividade catalítica de enzimas, abertura/fechamento de canais iônicos, atividade de receptores, atividade de fatores de transcrição, localização intracelular de proteínas e dinâmica do citoesqueleto (Greengard, 2001).

No SNC, tem sido bem documentada a cascata de sinalização da via PI3K-Akt e seu envolvimento na regulação da sobrevivência celular através de diversos mecanismos,

incluindo fosforilação e inibição de mediadores pró-apoptóticos (Datta *et al.*, 1999), e “upregulation” da expressão de genes com potencial antiapoptótico (Andjelkovic *et al.*, 1997; Meier *et al.*, 1997). Além disso, há evidências do envolvimento da via PI3K-Akt no metabolismo, através da sua atuação na captação de glicose (Kohn *et al.*, 1995; Kohn *et al.*, 1996).

1.5.1.1. Akt como Elemento Regulatório Essencial

A proteína quinase B (PKB) ou Akt é amplamente expressa em mamíferos, sendo que três membros desta família de serina/treonina cinases são conhecidos, sendo eles PKB α ou Akt1, PKB β ou Akt2, e PKB γ ou Akt3. A expressão celular da Akt pode variar entre os diferentes tipos de tecidos e células (Chong *et al.*, 2005). A Akt1 é a isoforma mais expressa. Embora a Akt2 seja expressa em níveis menores do que a Akt1, ela ocorre em tecidos responsivos à insulina, como músculo esquelético, fígado, coração, rins e tecido adiposo (Altomare *et al.*, 1995). Akt é parte da superfamília de proteínas cinases AGC (proteína cinase dependente de cAMP/proteína cinase G/proteína cinase C), e consiste de três domínios funcionais. O domínio N-terminal com homologia à plextrina (PH) fornece sítios de ligação para os fosfolipídios de membrana, os quais estão envolvidos no recrutamento da Akt para a membrana plasmática (Brazil *et al.*, 2004). O domínio catalítico da Akt tem especificidade por resíduos de serina ou treonina de proteínas substrato para Akt (Frech *et al.*, 1997). O domínio carboxil terminal possui um motivo hidrofóbico característico da família AGC (Peterson & Schreiber, 1999). A fosforilação dos resíduos de serina e treonina desse motivo hidrofóbico é necessária para a completa ativação da cinase (Andjelkovic *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2002; Brazil *et al.*, 2004; Hanada *et al.*, 2004).

Em diversos tipos celulares, fatores tróficos ou citocinas, via modulação de receptores tirosina cinases ou mesmo de receptores acoplados à proteína G, causam ativação da enzima fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K), junto à membrana celular (Fig. 11). Após a ativação, PI3K fosforila, na posição 3, os glicerofosfolipídeos de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PI(4,5)P₂] ou fosfatidilinositol 4-monofosfato [PI(4)P], resultando na produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) e fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PIP₂). Este evento conduz ao recrutamento de Akt junto à membrana plasmática, que, através da região com homologia à plextrina, liga-se aos PIP₂ ou PIP₃ de membrana, sendo sua transição do citosol para a membrana plasmática um evento essencial para sua ativação (Thomas *et al.*, 2002; Brazil *et al.*, 2004; Hanada *et al.* 2004). Assim, a Akt se torna disponível para a fosforilação pela PKD1 na Treonina (Thr)³⁰⁸ e por uma outra proteína cinase ainda não estabelecida na posição Serina (Ser)⁴⁷³ (Stephens *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1999; Brazil *et al.*, 2004; Hanada *et al.* 2004). A fosforilação dos resíduos de Thr-308 e Ser-473 é considerada crítica para a ativação da Akt (Bellacosa *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2002). Muitos dos efeitos antiapoptóticos desses fatores de crescimento podem ser atribuídos, em parte, à ativação desta via, o que foi primeiramente demonstrado em células PC12 por Yao e Cooper (1995).

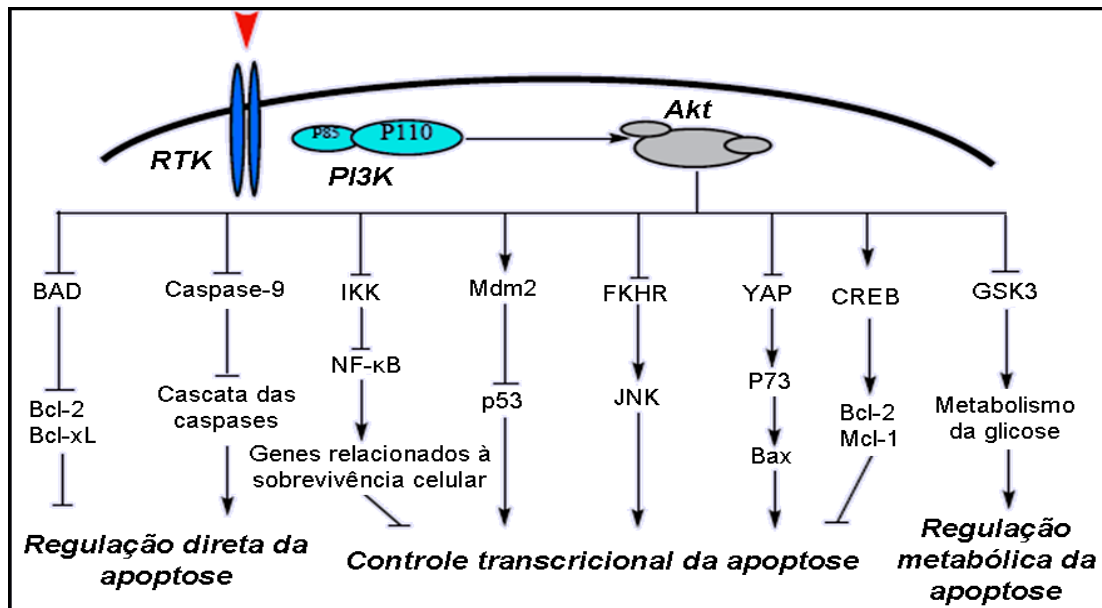


Fig. 11. Alvos da regulação da sobrevivência celular pela Akt. Modificado a partir de Song *et al.*, 2005.

Muitos estudos têm demonstrado que a ativação da Akt é necessária para a sobrevivência celular, sendo que a apoptose induzida pela retirada de fatores de crescimento, radiação UV, dano ao DNA, e tratamento com TGFβ, em muitos tipos celulares, é reduzida através da transfecção da Akt constitutivamente ativa. Em contraste, a introdução da Akt dominante negativa (ou inativa) bloqueia a sobrevivência de células mesmo na presença de fatores de crescimento, reforçando a significância desta via na prevenção de morte celular (Dudek *et al.*, 1997).

Akt é um fator de sobrevivência crítico que pode modular vias celulares no sistema nervoso central e periférico. Numerosos estudos identificaram a Akt como um fator chave na proteção contra a morte celular (Lawlor & Alessi, 2001). Estudos anteriores demonstraram que a superexpressão da Akt nos neurônios do SNC previne apoptose

induzida pela privação celular de fatores de crescimento (Datta *et al.*, 1997). Akt previne apoptose promovendo a sobrevivência celular. Isso ocorre, primariamente, via fosforilação da proteína pró-apoptótica BAD, desfazendo sua interação com as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2/Bcl-X_L e evitando a liberação mitocondrial do citocromo c (Datta *et al.*, 1997; Prasad *et al.*, 2000).

Portanto, tem sido bem documentado que Akt é necessária para a sobrevivência de neurônios (Crowder & Freeman, 1998). O aumento da forma ativa da Akt (fosfo-Akt) pode promover a sobrevivência celular durante exposição a radicais livres ou estresse oxidativo (Matsuzaki *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003a,b), dano ao DNA (Henry *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003a), pré-condicionamento hipóxico (Wick *et al.*, 2002), exposição ao peptídeo β -amilóide (Wick *et al.*, 2002), e administração de TGF- β (Conery *et al.*, 2004).

A ativação da Akt, porém, nem sempre é desejada. Sob certas condições, a sobrevivência celular aumentada durante a ativação da Akt poderia fomentar o crescimento de células neoplásicas. Um estudo recente identificou a Akt como um alvo potencial a ser bloqueado durante o tratamento de células cancerosas que contêm mutações no fator de crescimento epidérmico (EGF) (Sordella *et al.*, 2004).

1.5.1.2. Papel de radicais livres e ERO na sinalização celular

Recentemente, tem sido proposto que as espécies reativas de oxigênio possuem um papel no mecanismo coordenado da sinalização celular. Foi demonstrado que elas estimulam um grande número de vias de transdução de sinal que são importantes na manutenção da homeostase celular neuronal (Borg & London, 2002).

As complexas redes de sinalização envolvem numerosas vias bioquímicas, e têm sido extensivamente estudadas quanto ao seu papel na sobrevivência ou morte celular em consequência de processos neurodegenerativos ou de injúria ao SNC. Como mostrado na Fig. 12, muitas dessas vias podem ser reguladas pelo estado redox celular como consequência, por exemplo, da modificação oxidativa de proteínas ou de sítios específicos (Finkel, 1998).

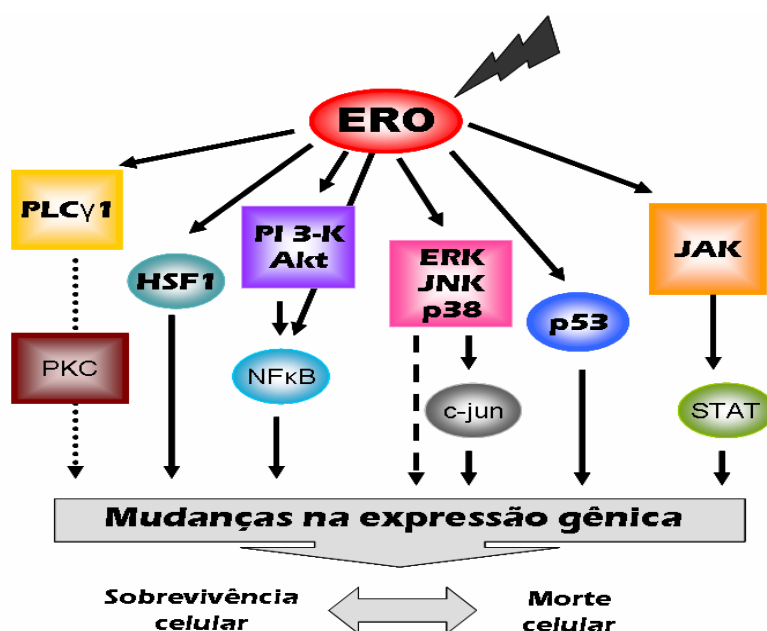


Fig. 12. Vias que podem ser mediadas por estresse oxidativo. ERO ativam muitas vias de sinalização celular. Algumas podem estar envolvidas na promoção de morte celular, como as vias de p38, JNK, p53 e JAK/STAT, enquanto outras cascatas, como aquelas envolvendo ERK1/2, Akt e HSF-1 têm sido propostas como citoprotetoras (modificado a partir de Martindale & Holbrook, 2002).

As cascatas de sinalização envolvidas na sobrevivência celular são complexas e os mecanismos de modulação destas vias pelos diversos fatores, incluindo ERO, não são bem compreendidos. Estudos têm demonstrado que a ativação de JNK e p38^{MAPK} por ERO implica na promoção de morte celular, e que a ativação de vias como ERK1/2 e AKT têm

se mostrado neuroprotetoras (Martindale & Holbrook, 2002; Hanada *et al.*, 2004; Murphy & Blenis, 2006). Entretanto, na dependência do tempo de ativação e do compartimento celular, podem ser observadas variações na ação de cada uma das MAPK quanto à capacidade de causar dano ou proteção celular nas resposta de estresse (Chen *et al.*, 2004; Waetzig & Herdegen, 2005; Murphy & Blenis, 2006).

No que tange especificamente a modulação de Akt por ERO pode ser citado que o peróxido de hidrogênio pode levar à ativação endógena da Akt em diversas linhagens celulares, tais como células Hela, A549 e glioblastoma humano (Sonoda *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000). Além disso, a ativação da Akt tem sido demonstrada durante estresse oxidativo em linhagens de células neuronais (Kang *et al.*, 2003a,b; Salinas *et al.*, 2003), células primárias de hipocampo (Matsuzaki *et al.*, 1999) e neurônios corticais (Crossthwaite *et al.*, 2002; Chong *et al.*, 2003).

Diante da importância do zinco na promoção de estresse oxidativo e na regulação de diversos alvos protéicos, incluindo a possível modulação de Akt, considerando o papel fundamental desta proteína na regulação neural, se faz importante aprofundar o entendimento das ações moleculares do zinco sobre estes parâmetros. Desta forma, através da compreensão destas ações pretende-se contribuir para a melhor compreensão do papel neuroprotetor e neurotóxico do zinco no SNC.

2. OBJETIVOS

➤ Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar as ações do zinco sobre as defesas celulares antioxidantes *in vivo* e *in vitro*. Além disso, o estudo pretende investigar possíveis ações do zinco na modulação de alguns alvos moleculares relacionados à sinalização celular e que poderiam intermediar ações fisiológicas ou patológicas do metal.

➤ Objetivos Específicos

1. Determinar o conteúdo de glutathiona total e enzimas antioxidantes (GPx, GST, catalase e GR), em hipocampo e córtex cerebral de ratos jovens tratados *in vivo* com zinco.
2. Determinar a atividade das enzimas antioxidantes (GPx, GST, GR e GGT) em fatias de hipocampo de ratos jovens frente ao tratamento *in vitro* com zinco.
3. Investigar uma possível interação entre a ação do zinco e do peróxido de hidrogênio, relativo à modulação da viabilidade celular em fatias hipocampais de ratos jovens.
4. Caracterizar a modulação pelo zinco da fosforilação da proteína quinase Akt em fatias hipocampais de ratos jovens expostos *in vitro* ao metal, identificando o possível papel desta regulação na modulação da viabilidade celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Nos modelos experimentais foram utilizados ratos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Foram usados ratos jovens entre 8 e 13 dias de idade. Os animais tiveram acesso irrestrito a água e comida, e foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes ligadas das 7:00 às 19:00 h). Os animais foram manipulados e mortos de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela CEUA-UFSC (Protocolo No. 297/CEUA; Processo No. 23080.012517/2004-36).

3.2. Tratamentos *in vivo*

3.2.1. Tratamento Agudo ou com Doses Repetidas de ZnCl_2

Para o estudo da ação do ZnCl_2 *in vivo* sobre os níveis de GSH-t, e sobre a atividade das enzimas antioxidantes GPx, catalase, GR e GST, os animais com 13 dias de idade foram tratados com uma dose aguda de ZnCl_2 com uma injeção intraperitoneal de solução salina (NaCl 0,9%; controle) ou ZnCl_2 (1, 4 ou 16 mg/kg, diluído em solução salina). Os animais foram sacrificados 24 horas após a injeção.

No tratamento com doses repetidas, os animais foram tratados por cinco dias consecutivos (do 8º ao 12º dia pós-natal) com uma injeção diária intraperitoneal (i.p.) de solução salina (NaCl 0,9%; controle) ou ZnCl_2 (1, 2 ou 4 mg/kg, diluído em solução

salina). Os animais foram sacrificados no 14º dia pós-natal, ou seja, 48 horas após a última injeção.

Os animais foram mortos por decapitação e as estruturas rapidamente dissecadas sobre gelo. Para a determinação de GSH-t foi utilizado tecido fresco, enquanto que, para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, as estruturas foram preservadas em ambiente contendo gelo seco até seu armazenamento em freezer -80°C para posterior análise.

3.3. Tratamentos *in vitro*

Os animais foram mortos por decapitação e o cérebro rapidamente retirado e a seguir dissecado (4°C) sob papel filtro umedecido com tampão HEPES/salina (124 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1,2 mM de MgSO₄, 25 mM de HEPES, 12 mM de glicose e 1 mM de CaCl₂, pH 7.4), previamente oxigenado por 30 minutos. Os hipocampus foram isolados e rapidamente fatiados na espessura de 400 µm, utilizando um “fatiador” de tecidos de McIlwain. Após este procedimento, mantendo as fatias imersas em tampão HEPES/salina (4°C), foi realizada a seleção das fatias hipocampais com aproximadamente o mesmo tamanho para os procedimentos subseqüentes.

3.3.1. Tratamento das Fatias de Hipocampo.

As fatias hipocampais foram usadas para o estudo da ação do ZnCl₂ sobre a viabilidade celular, sobre a atividade das enzimas antioxidantes GPx, catalase, GR e GST. Neste sentido, fatias de hipocampo (10 fatias/tratamento) foram pré-incubadas, por 30 min,

com tampão HEPES/salina (300µl), em temperatura ambiente, para recuperação metabólica do tecido. Após esse período, o meio foi retirado e as fatias submetidas a incubações por um período de 2 horas (37°C), em tampão HEPES/salina (controle), ou este mesmo meio contendo 10, 30, 100 ou 300 µM de ZnCl₂. Nos estudos de modulação de viabilidade e de fosforilação de AKT, foi seguido o mesmo protocolo, exceto pela utilização de apenas uma fatia/tratamento, realizado em triplicata.

Para determinar se a ação do zinco sobre a viabilidade celular poderia ter sinergismo com a ação de agentes pró-oxidantes, as fatias foram incubadas com o zinco e, a seguir, com peróxido de hidrogênio. Neste protocolo, após pré-incubação (30 min) com tampão HEPES/salina, as fatias foram incubadas com diferentes concentrações de zinco (10–100 µM) por 2 horas (37°C). A seguir as fatias foram lavadas com tampão HEPES/salina e, então, foi adicionado H₂O₂ 1 mM por 1 hora adicional. Fatias incubadas com ZnCl₂ (10–100 µM; 2h) seguidas da incubação apenas com tampão HEPES/salina serviram como controle relativo à ação do zinco isoladamente.

3.4. Avaliação da Viabilidade Celular.

A viabilidade celular das fatias foi medida pelo método do MTT. Após os respectivos tratamentos, as fatias hipocampus foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml em tampão HEPES/salina) por 30 minutos a 37°C. O MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium = “Thiazolyl blue”) é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais (Liu *et al.*, 1997). O formazam é solubilizado com a adição de dimetil sulfóxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica é

medida em 550 nm em uma leitora de placas de 96 poços. A atividade mitocondrial (viabilidade celular) é diretamente proporcional à capacidade redutora sobre o MTT e, portanto, à produção de cromógeno.

3.5. Parâmetros Antioxidantes

O hipocampo ou córtex cerebral foram homogeneizados em 300 µl de tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 e centrifugados a 20.000 g por 30 min. O sobrenadante foi coletado para as dosagens das enzimas antioxidantes.

3.5.1. Avaliação da Atividade Glutathiona Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a redução do H_2O_2 , bem como de peróxidos orgânicos, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como co-substrato para esta reação para produzir glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutathiona redutase com o consumo de NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que pode ser acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm (Wendel, 1981; Flohé & Günzler, 1984). Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1 mM EDTA, GSH 1 mM e NADPH 0,1 mM. Adicionou-se amostra neste meio para mensurar o consumo inespecífico de NADPH através de uma leitura por 2 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato t-BOOH (hidroperóxido de tert-butila) 1 mM, a leitura foi realizada por mais 2 min. Ao decréscimo de absorbância por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas

diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 $\mu\text{mol/ml/min}$.

3.5.2. Avaliação da Atividade Glutathiona Redutase (GR)

A GR catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG, a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado em 340 nm. A velocidade de consumo do NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (Carlberg e Mannervik, 1985). O meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 1 mM de EDTA e NADPH 0,2 mM. Após adicionar a amostra, o consumo inespecífico de NADPH foi medido por 2 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato GSSG 1 mM, a leitura foi realizada por 2 min adicionais. Do decaimento por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 $\mu\text{mol/ml/min}$.

3.5.3. Avaliação da Atividade Glutathiona S-Transferase (GST)

A GST catalisa a conjugação da GSH com o substrato sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) que produz um conjugado que é detectado em 340 nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig & Jakoby, 1981). Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, 1 mM de EDTA e GSH 1 mM. Foram feitas leituras independentes realizadas por 2 min para

mensurar a velocidade da reação espontânea do CDNB com GSH, neste caso, sem a presença da amostra. Depois de acrescentar a amostra e o segundo substrato (CDNB 1 mM) ao meio de reação, realizou-se a leitura por 2 min a 340 nm. Ao decaimento por minuto obtido com a amostra, descontou-se a velocidade da reação espontânea. O valor obtido pelo coeficiente de extinção molar do conjugado GSH/CDNB ($\epsilon = 9.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 $\mu\text{mol/ml/min}$.

3.5.4. Avaliação da Atividade Catalase (CAT)

A alta velocidade de reação desta enzima, associada a uma baixa “afinidade”, permite a determinação de sua atividade na presença de concentrações elevadas de H_2O_2 (10 mM). A atividade é determinada pela velocidade de consumo da H_2O_2 no primeiro minuto da reação. A leitura foi realizada em 240 nm (Aebi, 1984).

3.5.5. Avaliação da Atividade γ -Glutamil Transpeptidase (GGT)

A atividade da GGT foi analisada nos “pellets” das fatias submetidas à centrifugação, os quais foram ressuspensos em tampão HEPES 20 mM pH 7,0. Os tecidos foram incubados com γ -glutamyl p-nitroanilide e o dipeptídeo glicil-glicina. A GGT transfere a porção γ -glutamyl da γ -glutamyl p-nitroanilide. No processo de transferência do grupo gama-glutamil do substrato sintético gama-glutamil-p-nitroanilida para glicil-glicina, um cromóforo é formado e lido em 410 nm. A formação da cor é diretamente proporcional à atividade da enzima (Meister *et al.*, 1981; Griffith, 1981).

3.5.6. Mensuração dos Níveis de GSH Total (GSH-t)

O hipocampo e o córtex cerebral foram homogeneizados em ácido perclórico (PCA) 0,5 M. As amostras foram centrifugadas por 2 min a 15.000 g, e o sobrenadante foi retirado e diluído 10 vezes em tampão fosfato de potássio, 0,1 M, pH 7,0, para assim neutralizar a amostra.

O método utilizado é enzimático e foi originalmente descrito por Tietze (1969), e posteriormente modificado por Akerboom e Sies (1981). Este método é cíclico e detecta tanto GSSG como GSH, definido como glutathiona total (GSH-t). As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 412 nm por 2 min, contendo fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0, 0,2 U/ml de GR, 0,1 mM DTNB, 1 mM EDTA e 0,2 mM NADPH. A concentração de glutathiona foi obtida através da realização de uma curva padrão com concentrações conhecidas de GSSG. Os valores são expressos em $\mu\text{mol/g}$ tecido fresco.

3.6. Dosagem de Proteínas

Para a análise através de Western Blotting, as proteínas foram dosadas através do método de Peterson (1977). Sobre alíquotas de 3 μl das amostras foram adicionados 397 μl de água e 400 μl do reagente de Lowry (0,2 N de NaOH, 2,5% de SDS, 5% de Na_2CO_3 , 0,2% de CuSO_4 e 0,1% de tartarato duplo de sódio e potássio). As amostras foram agitadas imediatamente e deixadas em repouso por dez minutos. Em seguida foram adicionados 200 μl do reagente de FOLIN 0,4 N, seguido de agitação imediata, e incubadas por 30 minutos.

A leitura foi realizada em 750 nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva-padrão utilizando albumina de soro bovino (BSA).

Para a análise da atividade da glutatona e das enzimas antioxidantes, o conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (1976). A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm, usando albumina de soro bovino como padrão.

3.7. Separação de Proteínas

As fatias hipocampais foram colocadas individualmente em tampão de amostra (4 % de SDS, 50 mM de Tris e 100 mM de EDTA , pH 6.8) e aquecidas por cinco minutos para permitir a solubilização do tecido. Foram usados 100µl de tampão de amostra por fatia. Cada fatia hipocampal de animais de 14 dias tinha, em média, 150µg de proteína. Em seguida foi adicionada a solução de diluição de amostra (40% de glicerol, 25mM de Tris e Bromofenol Blue; pH 6.8), numa proporção solução de diluição/solução de amostra de 25:100 (v/v), e 8% de β -mercaptoetanol. As proteínas (50µg/poço) foram separadas por eletroforese em minigel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), usando gel de separação a 10% e gel de entrada a 4% de acrilamida. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 20 mA por placa e voltagem máxima de 140 V, por aproximadamente 2,5 h, em temperatura ambiente, utilizando-se o tampão superior (190mM de glicina, 25mM de Tris e 0,1% de SDS) e o inferior (50 mM de Tris; pH 8.3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

3.8. Eletrotransferência e Imunodeteção

Após a eletroforese o gel foi fixado durante 1 hora em solução fixadora (50% de metanol e 8% de ácido acético) e a seguir foi lavado com tampão superior de eletroforese (25 mM de Tris, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) por 30 minutos. Após esse período, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (50 mM de Ácido Bórico e 4 mM de EDTA; pH 8.9) durante 30 minutos. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose no sentido do pólo negativo para o positivo, utilizando um “sanduíche” compreendido de espuma de suporte, papel filtro, gel, nitrocelulose, novamente papel filtro e espuma de suporte. A transferência foi realizada a 4°C usando corrente de 400 mA por 3 horas em uma cuba contendo tampão de transferência. Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau [0,5% de Ponceau (w/v) em 1% de ácido acético (v/v)] para controle da transferência.

Para a imunodeteção as membranas foram lavadas primeiro com água miliQ, depois com TBS (10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 7.5). A seguir foram bloqueadas por 1 hora com 5% de leite desnatado em TBS em temperatura ambiente. Após esse primeiro bloqueio, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%, 10 mM de Tris e 150 mM de NaCl, pH 7.5) e submetidas a um segundo bloqueio de 1 hora usando uma solução de 1,5% de gelatina em TBS. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes (5 minutos cada) com TBS-T, para finalmente serem incubadas com o anticorpo primário anti-fosfo Akt (p-serina-473) durante 12-14h e anti-Akt total por um período de 2 horas à temperatura ambiente.

Após as incubações, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T (4 vezes de 5 minutos) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos secundários

específicos (conjugados à peroxidase). Para a imunodeteção, as membranas foram lavadas 4 vezes (5 minutos) com TBS-T e 2 vezes com TBS, sendo que as bandas correspondentes às respectivas proteínas foram reveladas utilizando kit ECL (quimiluminescência) conforme as recomendações do fabricante. As medidas de fosforilação e/ou imunocontéudo das proteínas foram realizadas através de densitometria. Para análise de uma mesma membrana com sucessivos anticorpos foi realizado o “*strip de membrana*”, que consistia na sucessiva lavagem das membranas com: 1) água milli-Q, 2) NaOH 0,2 M, 3) água milli-Q e 4) TBS-T (5 min em cada).

3.9. Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA, seguido, quando apropriado, do teste de Duncan. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Estudos *in vivo*

4.1.1. Glutathiona total no hipocampo e no córtex cerebral de ratos jovens tratados com ZnCl_2 de forma aguda.

Os níveis de glutathiona total (GSH-t) em resposta ao tratamento agudo com ZnCl_2 (1, 4 ou 16 mg/kg) foram avaliados em hipocampo e córtex cerebral de ratos imaturos com 14 dias de idade (PN14). Os resultados mostraram que o tratamento com metal não causou alteração significativa dos níveis de GSH-t em nenhuma das estruturas analisadas (Fig. 13).

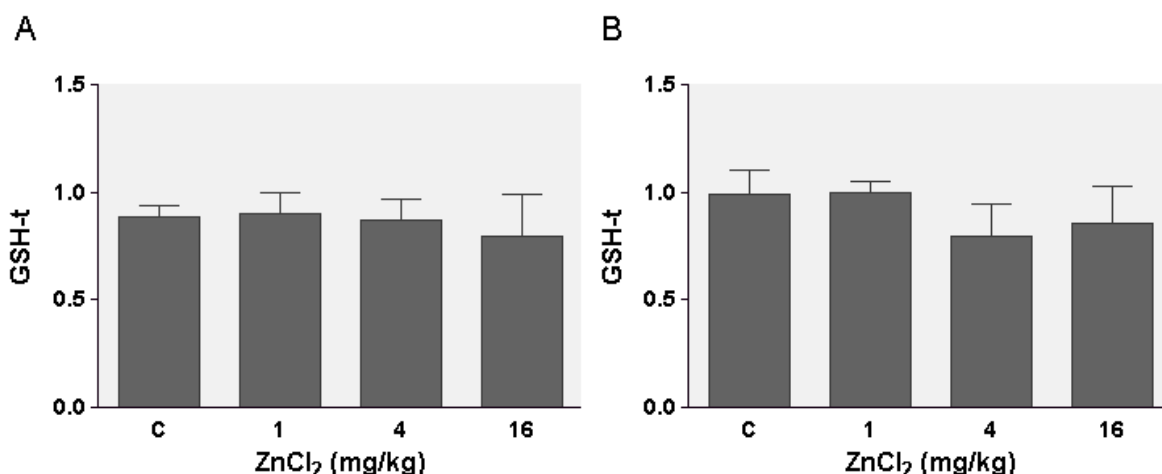


Fig. 13. Efeito do ZnCl_2 sobre os níveis de glutathiona total (GSH-t) em ratos jovens tratados com o metal de forma aguda. Os painéis mostram os níveis de GSH-t em hipocampo (A) e córtex cerebral (B) de ratos tratados no 13º dia pós-natal (PN13) com ZnCl_2 (1, 4 e 16 mg/kg; i.p.). Os animais controle recebiam injeção de salina. Todos os grupos foram avaliados no PN14. O conteúdo de glutathiona é expresso em $\mu\text{mol/g}$ tecido. Os valores representam as médias + E.P.M. (n = 5 - 6). O tratamento não causou alteração significativa nos níveis de GSH-t nas regiões estudadas.

4.1.2. Enzimas antioxidantes em hipocampo e córtex cerebral de ratos jovens tratados com ZnCl₂ de forma aguda.

O tratamento agudo de ratos imaturos (PN13) com ZnCl₂ aumentou significativamente a atividade das enzimas antioxidantes GPx [$F_{(3,18)} = 4,57$; $p \leq 0,05$] e GST [$F_{(3,18)} = 3,68$; $p \leq 0,05$] em hipocampo, quando comparados ao controle (Fig. 14 A e B). O aumento foi de 55% e 36% para a atividade de GPx e GST, respectivamente, e foi observado apenas na dose de ZnCl₂ 16 mg/kg. A atividade das enzimas catalase e glutathione redutase (GR) não sofreu alteração significativa em resposta ao tratamento com o metal (Figura 14 C e D). Avaliando o córtex cerebral os resultados mostraram que o tratamento com ZnCl₂ (1, 4 e 16 mg/kg) não alterou, de forma estatisticamente significativa, a atividade das enzimas antioxidantes GPx, GST, catalase e GR (Fig. 15).

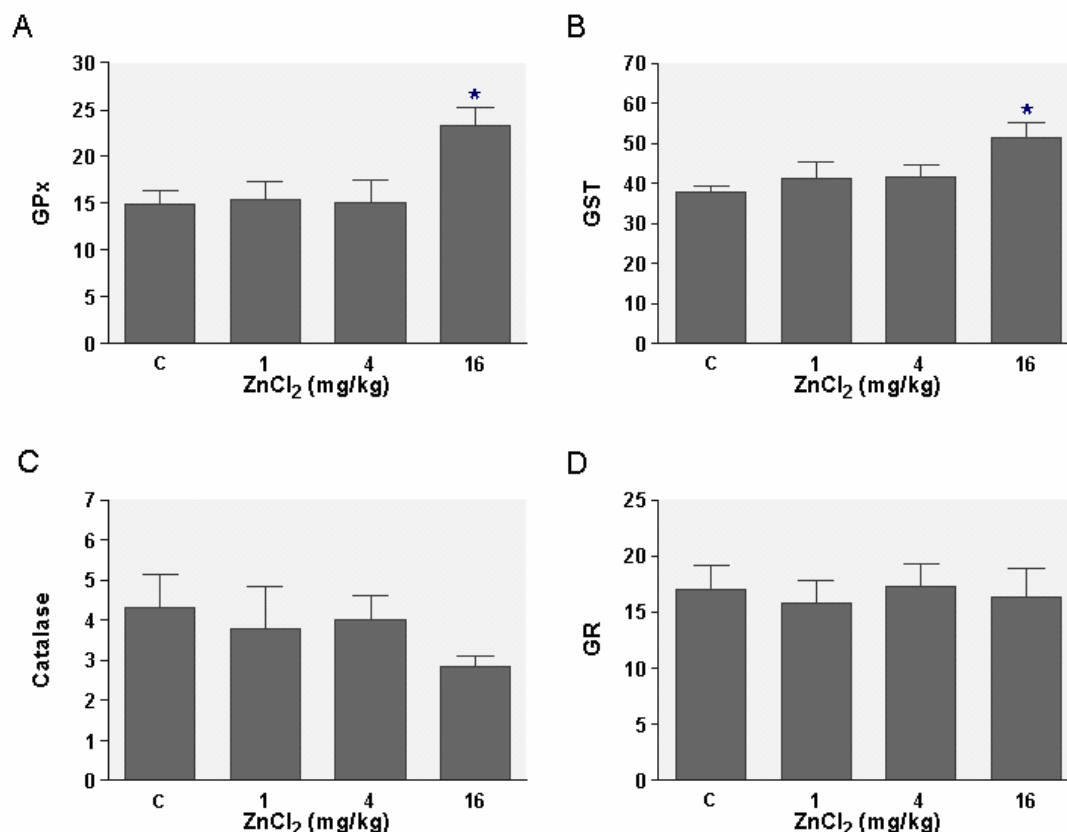


Fig. 14. Efeito do tratamento agudo com ZnCl₂ sobre a atividade das enzimas antioxidantes em hipocampo de ratos jovens. Os painéis mostram a atividade, no hipocampo, das enzimas glutathione peroxidase (GPx) (A), glutathione S-transferase (GST) (B), catalase (C), glutathione reductase (GR) (D) de ratos tratados no 13º dia pós-natal (PN13) com ZnCl₂ (1, 4 e 16 mg/kg; i.p.). Os animais controle recebiam injeção de salina. Todos os grupos eram avaliados no PN14. A atividade da enzima antioxidante GPx (A) demonstrou um aumento de 55% em relação ao controle na dose de 16 mg/kg de ZnCl₂. A atividade da enzima GST (B) demonstrou um aumento de 36% em relação ao controle, na dose de 16 mg/kg de ZnCl₂. O perfil da atividade das enzimas catalase (C), bem como GR (D) não sofreu nenhuma alteração significativa. Os valores da atividade das enzimas antioxidantes foram expressos como mU/mg de proteína. As barras representam as médias dos valores + E.P.M. (n = 5 - 6). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (solução salina).

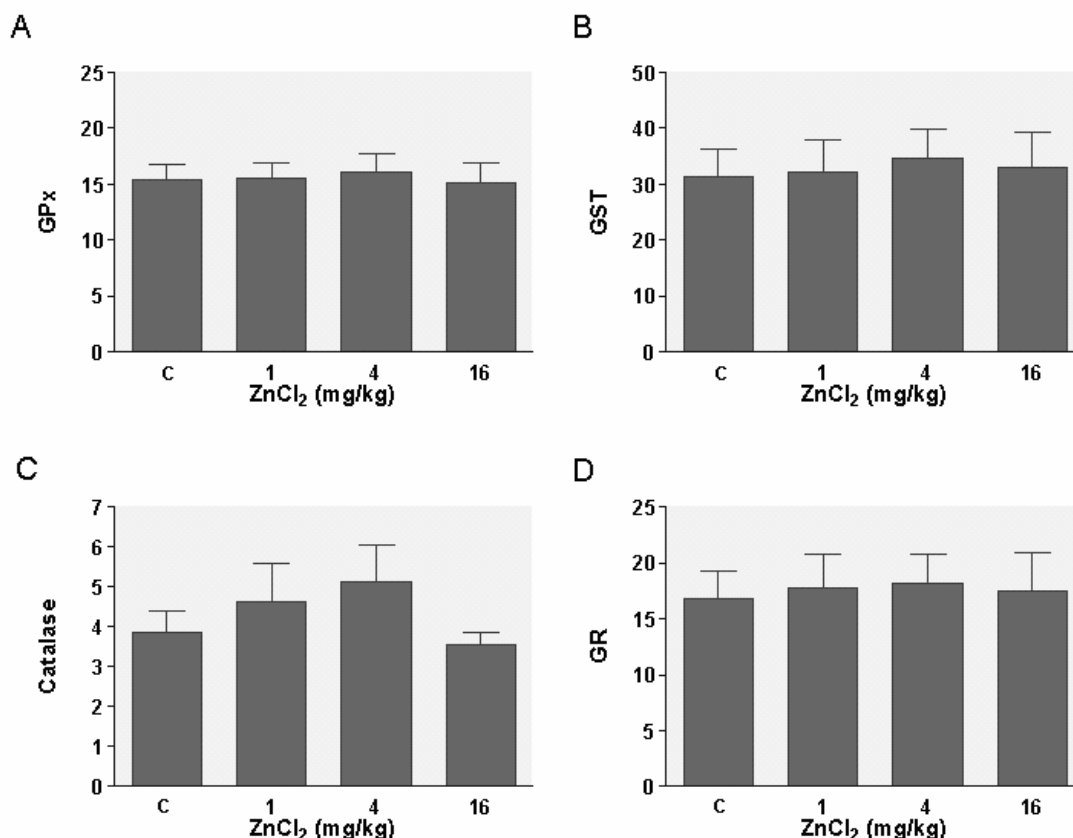


Fig. 15. Efeito do tratamento agudo com ZnCl₂ sobre a atividade de enzimas antioxidantes em córtex cerebral de ratos jovens. Os painéis mostram a atividade, no córtex cerebral, das enzimas glutathione peroxidase (GPx) (A), glutathione S-transferase (GST) (B), catalase (C), glutathione redutase (GR) (D) de ratos tratados no 13º dia pós-natal (PN13) com ZnCl₂ (1, 4 e 16 mg/kg; i.p.). Os animais controle recebiam injeção de salina. Todos os grupos eram avaliados no PN14. Os valores de atividade das enzimas antioxidantes foram expressos como mU/mg de proteína. As barras representam a média \pm E.P.M. (n = 6).

4.1.3. Glutathione total no hipocampo e no córtex cerebral de ratos jovens tratados com doses repetidas de ZnCl₂.

Os níveis de glutathione total (GSH-t) em resposta ao tratamento com doses repetidas de ZnCl₂ (1, 2 e 4 mg/kg), administradas em ratos imaturos do 8º ao 12º dia do período pós-natal (PN8-12), foram avaliados no hipocampo e no córtex cerebral de animais no 14º dia

pós-natal (PN14). Os resultados mostraram que o tratamento com ZnCl_2 não causou alteração significativa dos níveis de GSH-t no hipocampo ou córtex cerebral (Fig. 16).

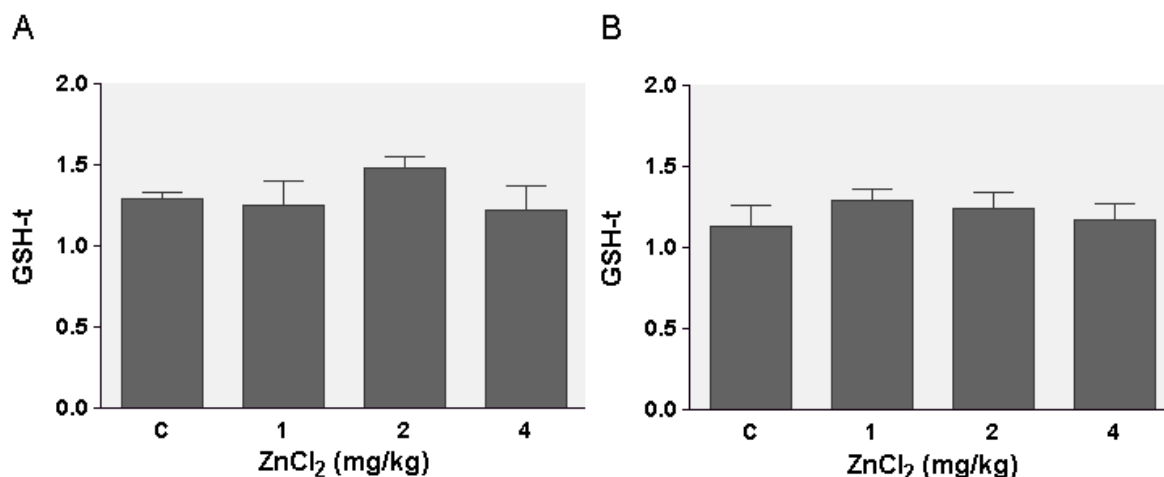


Fig. 16. Efeito do ZnCl_2 sobre os níveis de glutathiona total (GSH-t) em ratos jovens tratados com doses repetidas do metal. Os painéis mostram os níveis de GSH-t em hipocampo (A) e córtex cerebral (B) de ratos tratados com doses repetidas de ZnCl_2 . O tratamento compreendia a administração i.p. de ZnCl_2 (1, 2, e 4 mg/kg) no período do 8º ao 12º dia PN. Os animais controle recebiam injeção de salina. Todos os grupos eram avaliados no 14º dia PN. O conteúdo de glutathiona é expresso em $\mu\text{mol/g}$ tecido. Os valores representam as médias + E.P.M. ($n = 5 - 6$). Os tratamentos não causaram alteração significativa nos níveis de GSH-t nas regiões estudadas.

4.1.4. Enzimas antioxidantes em hipocampo e em córtex cerebral de ratos jovens tratados com doses repetidas de ZnCl_2 .

O tratamento de animais jovens com administração diária de ZnCl_2 , entre o 8º e 12º dias de vida pós-natal, aumentou significativamente em cerca de 52% a atividade de GPx na dose de 4 mg/kg [$F_{(3,20)} = 3,37$; $p \leq 0,05$] e a atividade de GST em 31% e 28% nas doses de 2 e 4 mg/kg [$F_{(3,20)} = 15,64$; $p \leq 0,01$], respectivamente (Figura 17 A e B) em relação ao grupo controle.

Os resultados também mostram que o tratamento com ZnCl_2 (1, 2 e 4 mg/kg) não alterou significativamente a atividade das enzimas antioxidantes GR e catalase no hipocampo de ratos jovens tratados com zinco (Fig. 17 C e D).

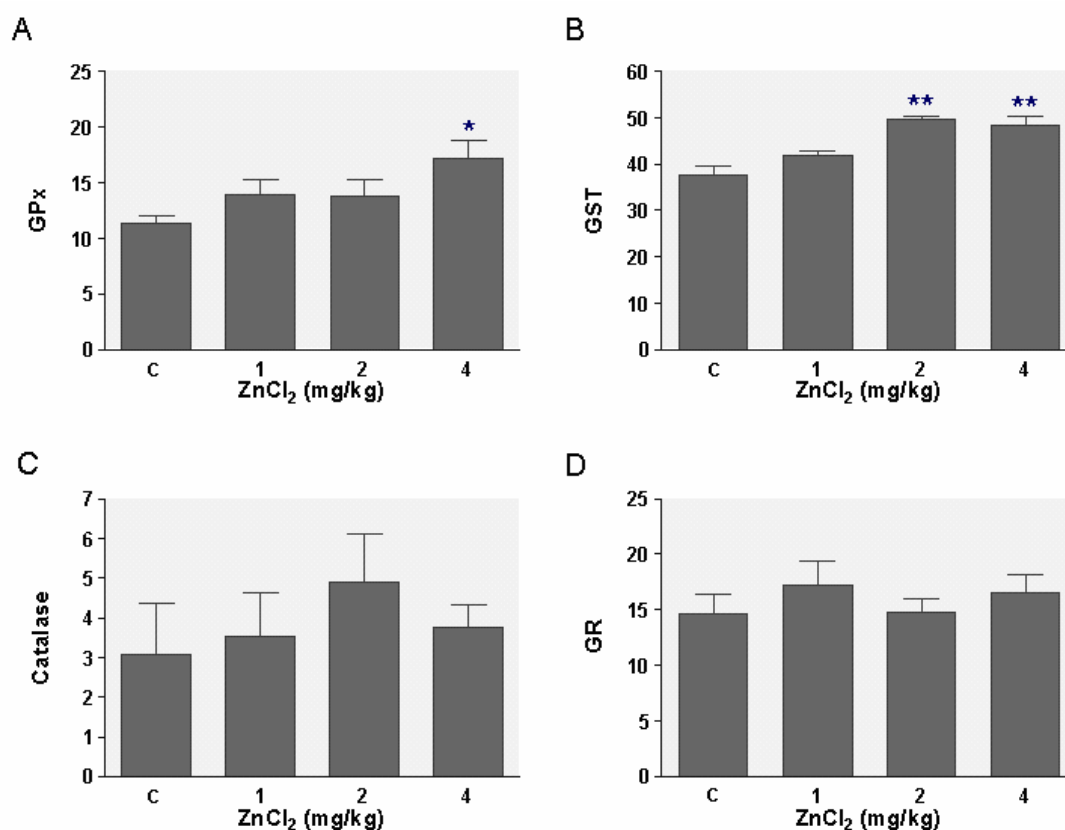


Fig. 17. Efeito do tratamento com doses repetidas com ZnCl_2 sobre a atividade das enzimas antioxidantes em hipocampo de ratos jovens. Os painéis mostram a atividade, no hipocampo, das enzimas glutathione peroxidase (GPx) (A), glutathione S-transferase (GST) (B), catalase (C) e glutathione redutase (GR) (D) de ratos tratados com doses repetidas de ZnCl_2 . O tratamento compreendia a administração i.p. de ZnCl_2 (1, 2, e 4 mg/kg) no período do 8º ao 12º dia PN. Os animais controle recebiam injeção de salina. Todos os grupos eram avaliados no 14º dia PN. O tratamento com ZnCl_2 na dose de 4 mg/kg causou um aumento de cerca de 52% na atividade de GPx (A) e nas doses de 2 e 4 mg/kg causou aumento da atividade de GST em cerca de 30% (B). Nenhuma das doses de ZnCl_2 testadas alterou a atividade das enzimas catalase (C) e GR (D). Os valores da atividade das enzimas antioxidantes foram expressos como mU/mg de proteína. As barras representam as médias dos valores + E.P.M. de seis experimentos (n = 6). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (solução salina).

A atividade enzimática de GPx, GST, catalase e GR não sofreu alteração no córtex de ratos jovens por nenhum dos tratamentos com doses repetidas aplicados (ZnCl_2 1, 2 e 4mg/kg) (Fig. 18 A - D).

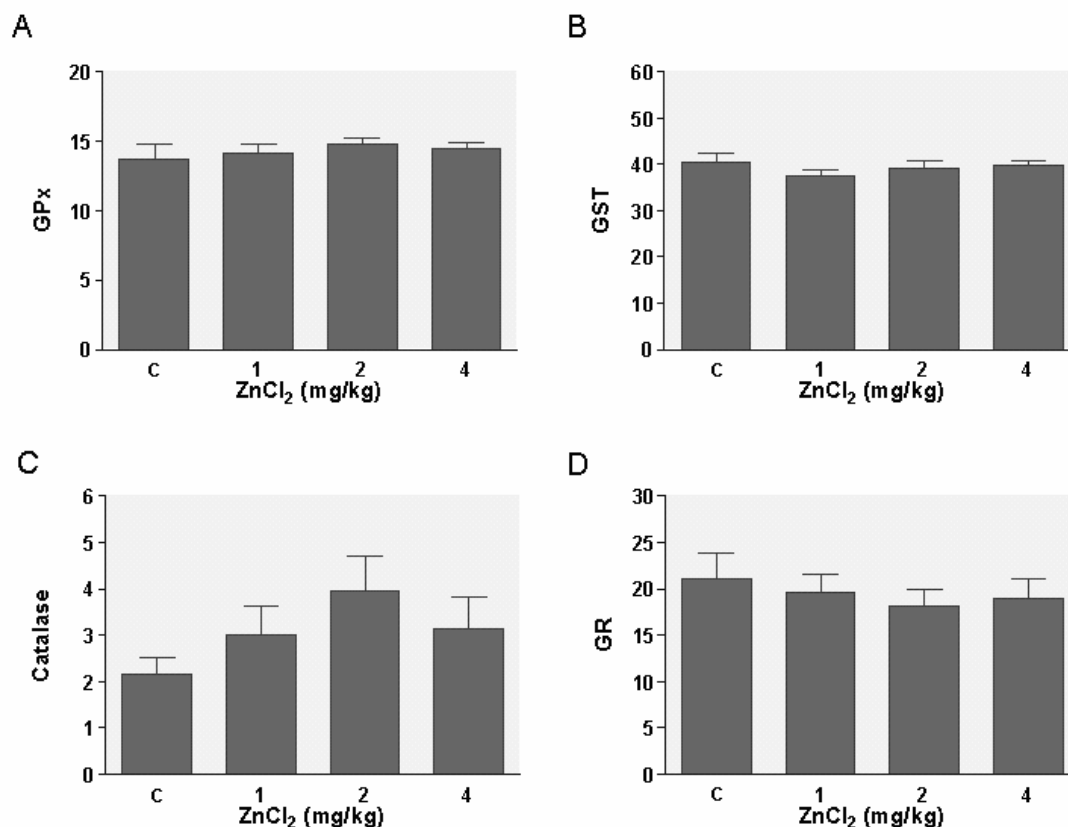


Fig. 18. Efeito do tratamento com doses repetidas com ZnCl_2 sobre a atividade das enzimas antioxidantes em córtex cerebral de ratos jovens. Os painéis mostram a atividade, no córtex cerebral, das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) (A), glutathiona S-transferase (GST) (B), catalase (C) e glutathiona redutase (GR) (D) de ratos tratados com doses repetidas de ZnCl_2 . O tratamento compreendia a administração i.p. de ZnCl_2 (1, 2, e 4 mg/kg) no período do 8º ao 12º dia PN. Os animais controle recebiam injeção de salina. Todos os grupos eram avaliados no 14º dia PN. Os tratamentos não modificaram a atividade no córtex cerebral de nenhuma das enzimas estudadas. Os valores da atividade das enzimas antioxidantes foram expressos como mU/mg de proteína. As barras representam as médias \pm E.P.M. (n = 6).

4.2. Estudos *in vitro* com fatias hipocampais de ratos jovens

4.2.1. Enzimas antioxidantes em fatias de hipocampo tratadas com diferentes concentrações de ZnCl_2 .

O tratamento *in vitro* de fatias hipocampais com ZnCl_2 (10, 30, 100 μM) diminuiu significativamente a atividade de GR [$F_{(4,37)}=44,46$; $p \leq 0,001$] em todas as concentrações testadas. O tratamento com ZnCl_2 10 μM causou uma redução, em relação ao controle, de 27 % na atividade de GR. Na concentração de ZnCl_2 30 μM , a atividade da enzima foi reduzida em 49%, enquanto na concentração de 100 μM , a atividade enzimática da GR foi reduzida em 75%. Estes resultados indicam um forte efeito inibitório do zinco sobre a atividade de GR e dependente de concentração (Fig. 19 D).

A atividade das enzimas antioxidantes GGT, GST e GPx também foi medida em fatias hipocampais de ratos jovens tratados *in vitro* com zinco. Os resultados mostraram que o tratamento com ZnCl_2 (10 - 100 μM) não alterou, de forma estatisticamente significativa a atividade de nenhuma das enzimas estudadas (Fig. 19 A - C).

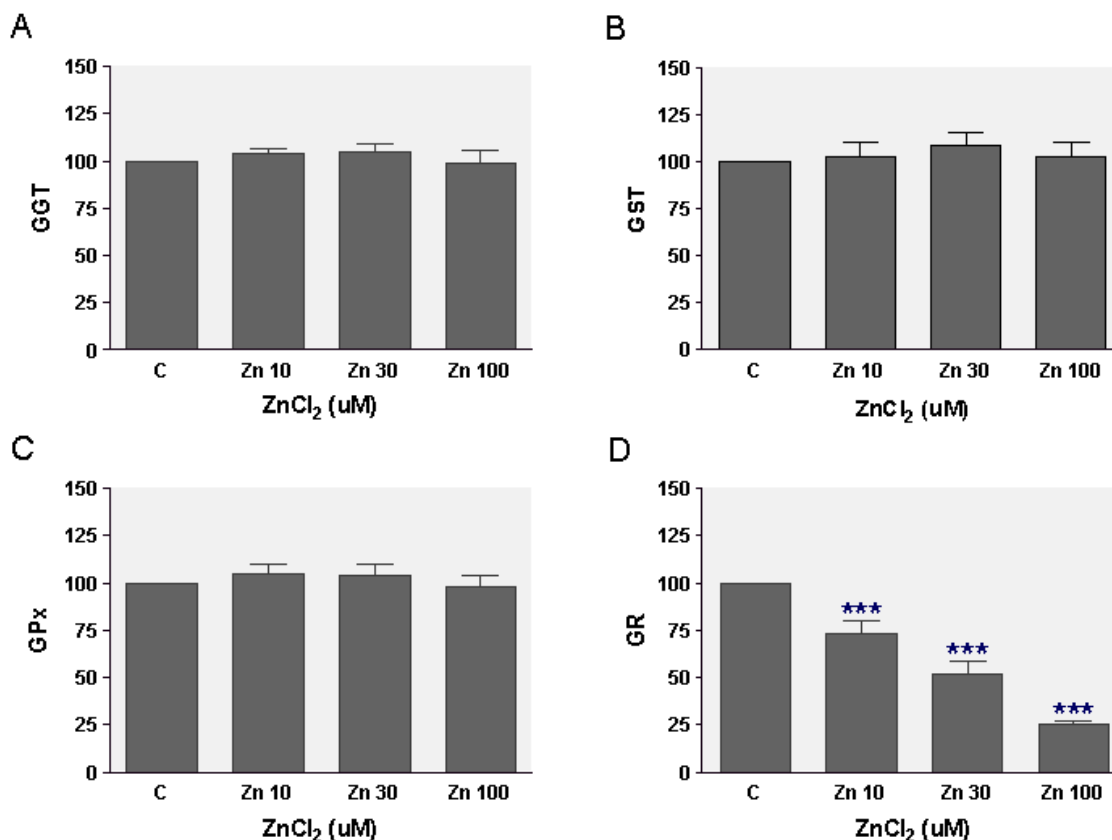


Fig. 19. Atividade de enzimas antioxidantes de fatias hipocâmpais em resposta ao tratamento *in vitro* com ZnCl_2 . Fatias de hipocampo de ratos jovens foram expostas durante 2 h às concentrações indicadas de ZnCl_2 . Após homogeneização as fatias foram ensaiadas para medida da atividade das enzimas: γ -glutamyltranspeptidase (GGT) (A), glutathione S-transferase (GST) (B), glutathione peroxidase (GPx) (C) e glutathione reductase (GR) (D). A atividade de GR foi fortemente reduzida pelo ZnCl_2 de forma dose dependente. Os dados estão expressos como porcentagem do controle (100 %). Os valores da atividade das enzimas antioxidantes foram expressos como mU/mg de proteína. As barras representam as médias + E.P.M. (n = 5-8). A média \pm E. P. M. da atividade das enzimas antioxidantes no grupo controle foram: GGT $3,39 \pm 0,15$; GST $34,62 \pm 3,99$; GPx $7,18 \pm 1,74$; e GR $17,2 \pm 0,71$ mU/g. *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

4.2.2. Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocâmpais expostas ao ZnCl_2 .

Os resultados mostraram que o tratamento com ZnCl_2 diminuiu a viabilidade celular em fatias hipocâmpais de forma dependente de concentração quando comparado aos grupos-controle. O ZnCl_2 , após 2 horas de incubação na concentração de 100 μM , diminuiu significativamente, em 20%, a viabilidade celular [$F_{(4,26)} = 7,13$; $p \leq 0,001$] (Fig. 20). ZnCl_2 10 e 30 μM não causaram modificação significativa da viabilidade celular. ZnCl_2 300 μM causou um efeito similar ao ZnCl_2 100 μM . Com base nestes dados e considerando os possíveis níveis sinápticos do metal (Frederickson *et al.*, 2005), optamos por utilizar ZnCl_2 100 μM como concentração máxima de metal, nos estudos de modulação de viabilidade e de sinalização celular.

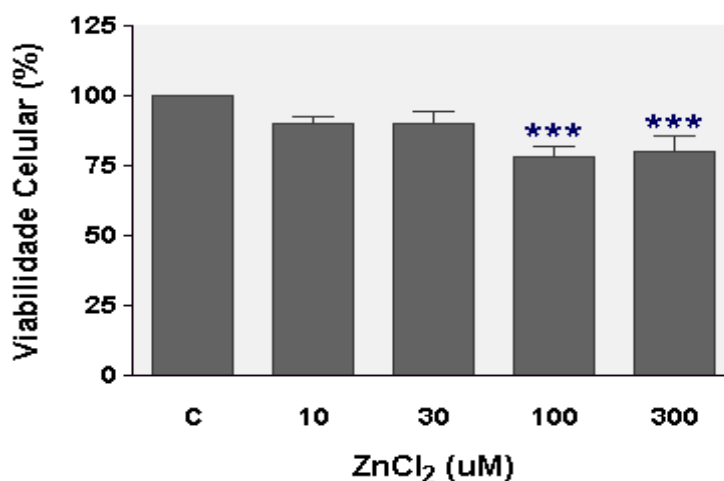


Fig. 20. Efeitos do ZnCl_2 sobre a viabilidade de fatias de hipocâmpos. Fatias de hipocampo foram incubadas por 2 h com tampão HEPES/salina (Controle; C) ou com este mesmo tampão contendo ZnCl_2 (10–100 μM). Após os tratamentos as fatias foram ensaiadas para avaliação de viabilidade através do teste do MTT. Os valores estão expressos como percentagem do controle. As barras representam as médias expressas em percentagem + E.P.M. em relação ao controle (100%) ($n = 7$). *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

4.2.3. Efeito do pré-tratamento com ZnCl_2 sobre a redução da viabilidade celular causada pelo peróxido de hidrogênio em fatias hipocampus.

Previamente determinamos que o tratamento de fatias hipocampus com H_2O_2 1 mM (1 h) causava diminuição da viabilidade celular, medida pelo MTT. Considerando que o ZnCl_2 foi capaz de inibir *in vitro* a atividade de glutathione redutase (GR), uma enzima envolvida na defesa antioxidante, buscou-se estudar uma possível interação entre o tratamento com zinco e a suscetibilidade das fatias frente a compostos pró-oxidantes como o H_2O_2 . Desta forma, fatias hipocampus foram pré-incubadas com ZnCl_2 (10 - 100 μM) por 2 h. Após este período, as fatias foram lavadas com tampão HEPES/salina e foi adicionado H_2O_2 1 mM. As fatias foram incubadas por mais 1 h. Os resultados mostram que o zinco ou H_2O_2 individualmente diminuem a viabilidade das fatias hipocampus em cerca de 20%. Entretanto, o pré-tratamento (2h) com ZnCl_2 seguido da incubação com H_2O_2 1 mM (1h) não causou modificação da viabilidade celular, quando comparado aos tratamentos com zinco ou peróxido de hidrogênio aplicados isoladamente. Portanto, aparentemente não há interação entre os dois insultos, sendo que a pré-incubação com zinco não torna as fatias hipocampus mais suscetíveis a citotoxicidade induzida pelo H_2O_2 1 mM (1h) (Fig. 21).

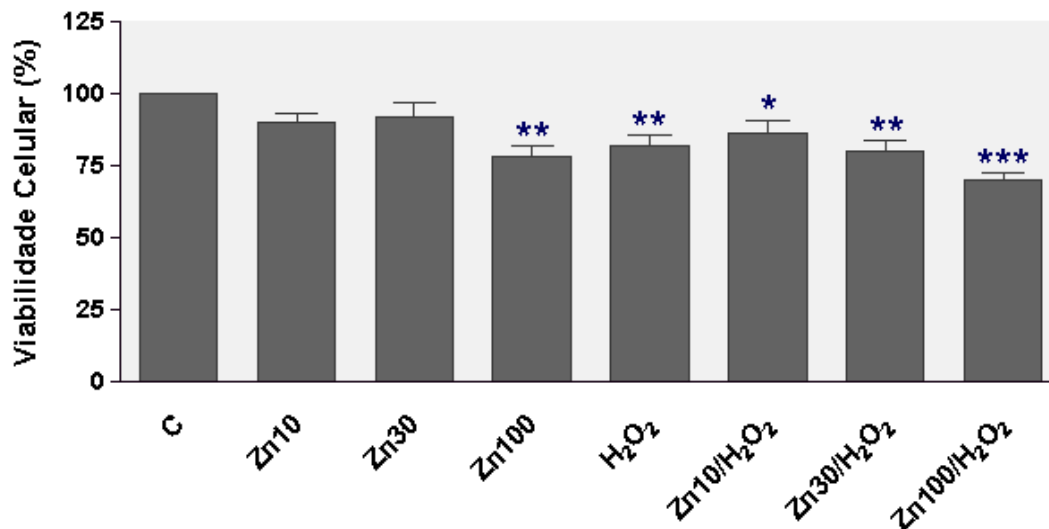


Fig. 21. Efeito do tratamento de zinco e H₂O₂ na redução do MTT em hipocampo de ratos jovens. Fatias de hipocampus foram incubadas com tampão HEPES/salina (C) ou ZnCl₂ (Zn10–100 μ M) por 2 h. A seguir, as fatias foram lavadas com tampão HEPES/salina e incubadas na ausência ou presença de H₂O₂ 1 mM (H₂O₂). Fatias contendo somente ZnCl₂ 10 a 100 μ M foram incubadas pelo mesmo período e serviram como controle para o efeito do zinco. Os valores estão expressos como percentagens relativas ao controle (100%) e representam as médias \pm E.P.M. (n = 7). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. Não foram encontradas outras diferenças significativas.

4.2.4. Fosforilação da Akt em fatias hipocampais de ratos jovens tratadas com ZnCl₂.

A modulação da fosforilação de Akt foi analisada em fatias de hipocampo expostas ao ZnCl₂ (10-100 μ M). A Figura 22 A mostra a fosforilação do sítio de Ser-473 de Akt e o conteúdo total de Akt, respectivamente. A Figura 22 B mostra a quantificação da fosforilação desta proteína quinase. O tratamento com zinco 100 μ M por 2 horas aumentou significativamente o nível de fosforilação da Akt (P-Ser-473) em aproximadamente 230% em relação ao controle [$F_{(4,34)} = 4,45$; $p \leq 0,01$]. O ZnCl₂ não alterou significativamente o imunoc conteúdo de Akt (Fig. 22 A).

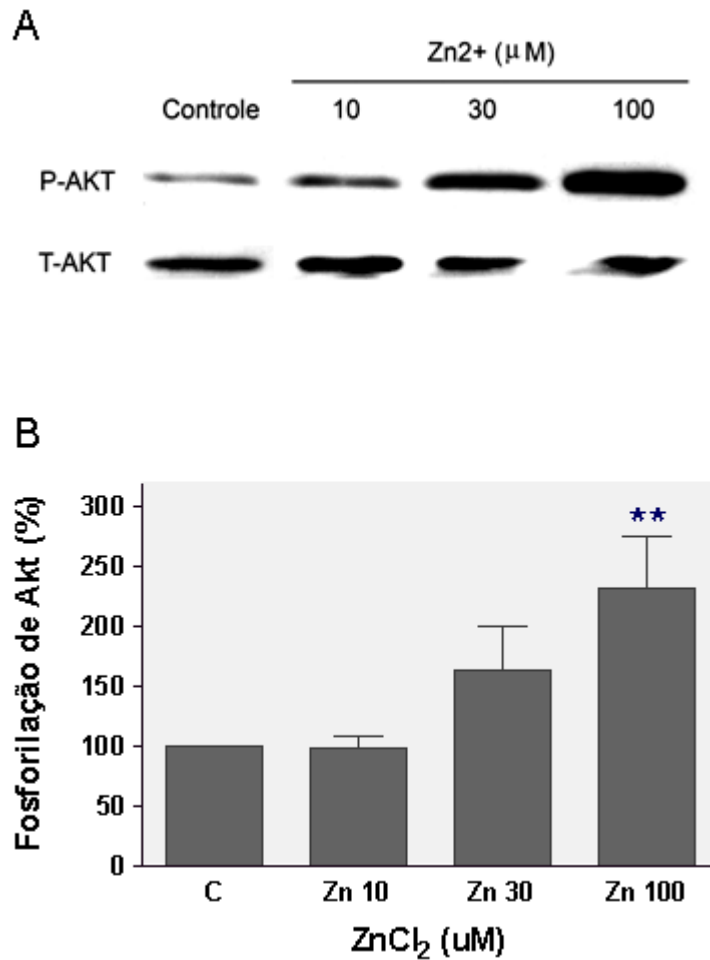


Fig. 22. Efeito do ZnCl₂ sobre a fosforilação da proteína Akt em fatias hipocâmpais de ratos jovens.

Fatias hipocâmpais foram incubadas por 2 horas na ausência (controle) ou em presença de ZnCl₂ (10-100 μ M). As proteínas foram separadas em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A fosforilação e o conteúdo total de AKT foram detectados por ECL. **A)** Mostra um “imunoblotting” representativo das formas fosforilada (P-AKT) e total (T-AKT) de AKT. **B)** Mostra a análise quantitativa da fosforilação da proteína Akt em resposta a exposição ao ZnCl₂. As bandas foram quantificadas por densitometria. A fosforilação de Akt foi medida como a razão da densidade óptica (D.O.) da forma fosforilada relativo à D.O. da forma total. Os resultados estão expressos como percentagem do controle (C; HEPES/salina) considerado 100% e representam a média \pm E.P.M (n = 9). ** $P < 0.01$ quando comparado ao grupo controle.

4.2.5. Ação do inibidor da PI3K (LY294002) sobre a fosforilação da Akt induzida pelo ZnCl₂.

O efeito do inibidor da PI3K (LY294002; 20 µM) foi avaliado em fatias de hipocampo de ratos jovens tratados com ZnCl₂. A exposição das fatias hipocampais ao inibidor de PI3K, LY294002, reverteu significativamente, o efeito produzido pelo ZnCl₂ sobre a fosforilação da proteína Akt [$F_{(4,34)} = 4,45$; $p \leq 0,001$] (Fig. 23).

4.2.6. Ação do inibidor da PI3K (LY294002) sobre a viabilidade celular em fatias hipocampais expostas ao ZnCl₂.

Sabendo-se que a via PI3K/AKT está envolvida nos mecanismos de crescimento, diferenciação, desenvolvimento e inibição de apoptose (Lee *et al.*, 2006), foi utilizado o inibidor de PI3K, LY294002, para confirmar se a ativação de AKT estaria amenizando a citotoxicidade do zinco. A Figura 24 mostra o efeito da pré-incubação (1h) com LY294002 seguido da co-incubação por 2h de LY294002 com ZnCl₂. Os resultados mostram que a pré-incubação com o inibidor de PI3K, tornou as fatias mais suscetíveis ao efeito citotóxico do zinco, considerando a dose de 30µM de ZnCl₂. Por outro lado, o tratamento com LY294002 não foi capaz de modificar a citotoxicidade causada pela exposição das fatias ao ZnCl₂ 100 µM (Figura 24). Embora, nestas condições, o LY294002 tenha sido efetivo na inibição da fosforilação (portanto ativação) de Akt em resposta ao ZnCl₂ 100 µM, conforme apresentado na Figura 23.

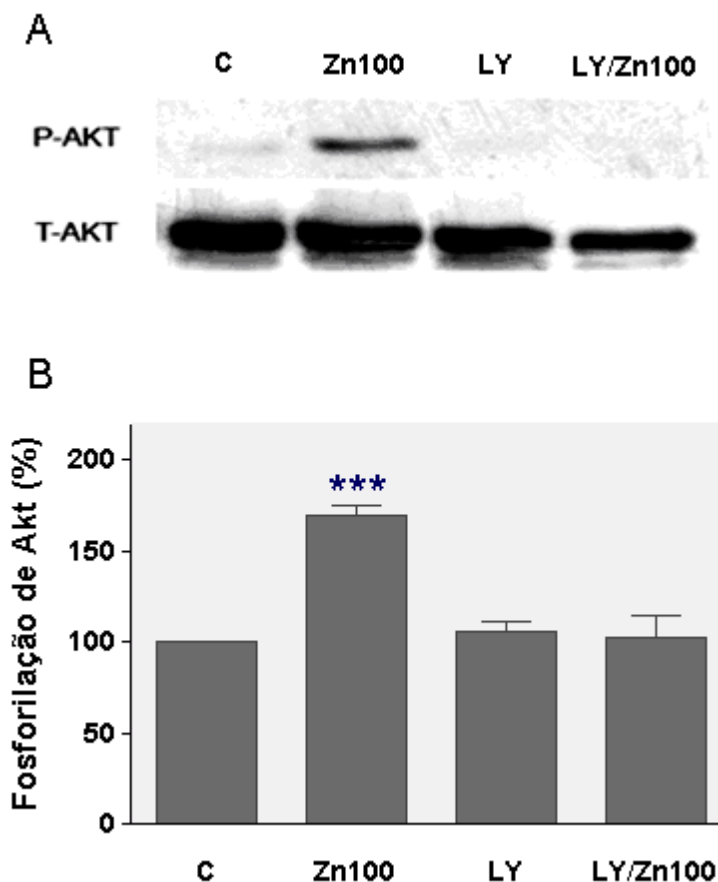


Fig. 23. Ação do inibidor de PI3K, LY294002, sobre a fosforilação de Akt em resposta ao tratamento *in vitro* com zinco.

Fatias hipocâmpais foram previamente incubadas com tampão HEPES/salina ou com LY294002 (20 μ M) por 1 hora. Em seguida foram incubadas por 2 horas em presença ou não de ZnCl_2 100 μ M (Zn100), ou LY294002 20 μ M (LY), ou ZnCl_2 /LY294002 (LY/Zn100). As fatias controle (C) foram pré-incubadas e incubadas com meio HEPES/salina contendo DMSO (0,1%). As proteínas foram separadas em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A fosforilação e o conteúdo total de AKT foram detectados por ECL. **A)** Mostra um “imunoblotting” representativo das formas fosforilada e total de Akt após a exposição ao ZnCl_2 na presença e na ausência de LY. **B)** Mostra a análise quantitativa da fosforilação da proteína Akt após a incubação com ZnCl_2 na presença ou ausência de LY. As bandas foram quantificadas por densitometria. A fosforilação de Akt foi medida como a razão da densidade óptica (D. O.) da forma fosforilada relativo à D.O. da forma total. Os resultados estão expressos como percentagem do controle (C; HEPES/salina contendo 0,1% DMSO) considerado 100% e representam a média \pm E.P.M (n = 3). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida pelo teste de Duncan. ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

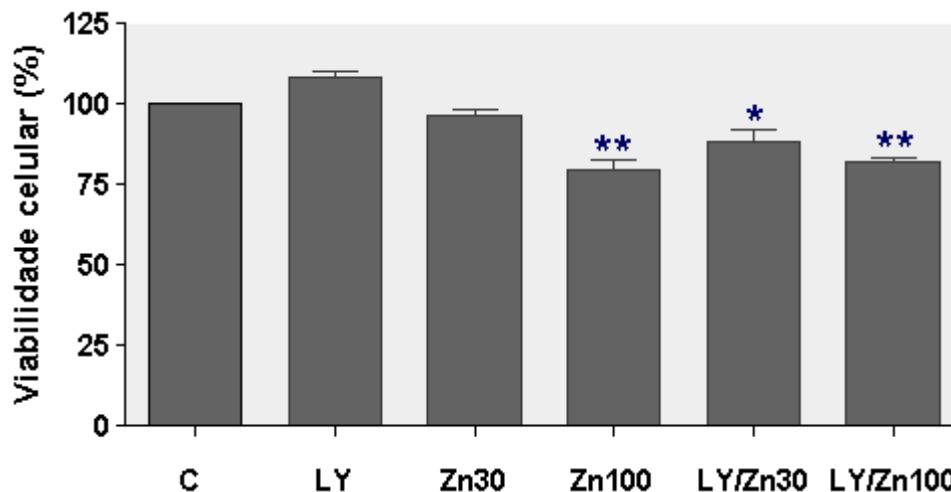


Fig. 24. Ação do inibidor da PI3K/Akt, LY294002, sobre os efeitos do ZnCl_2 na redução do MTT.

Fatias hipocâmpais foram incubadas com tampão HEPES/salina ou com LY294002 (20 μM) por 1 hora. A seguir o meio foi trocado e as fatias incubadas por 2 horas em presença ou não de ZnCl_2 (100 μM), ou LY294002 (20 μM), ou ZnCl_2 /LY294002. As fatias controle foram pré-incubadas e incubadas com o veículo (HEPES/salina contendo DMSO (0,1%)). Os valores estão expressos como percentagens relativas ao controle (100%) e representam as médias \pm E.P.M. ($n = 5$). * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (DMSO).

5. DISCUSSÃO

Os níveis de GSH-t no córtex cerebral e no hipocampo de ratos jovens, tratados tanto de forma aguda quanto com doses repetidas de ZnCl_2 , não mostraram diferença significativa em relação aos animais controle. Da mesma forma, em outros estudos, os níveis de GSH-t não foram alterados no córtex cerebral e hipocampo de ratos adultos tratados de forma aguda com ZnCl_2 (5 mg/Kg) (Brocardo *et al.*, 2005). Entretanto, tem sido demonstrado aumento nos níveis de GSH-t pela exposição *in vitro* ao ZnCl_2 . Em cultura de células epiteliais da retina, 150 μM de zinco induziu aumento nos níveis de GSH (Ha *et al.*, 2006). Em concentrações similares, via ativação das seqüências ARE (elemento de resposta a antioxidantes) no DNA, o zinco aumentou os níveis de RNA mensageiro da enzima de síntese de glutathione, glutamato-cisteína ligase (GCL) (Jaiswal, 2004; Kwak *et al.*, 2004). Por outro lado Chen & Liao (2003) demonstraram que o zinco *in vitro* pode reduzir os níveis de GSH em culturas corticais mistas de ratos, bem como reduzir a ativação de ARE e a síntese de GSH. Estes estudos aparentemente contraditórios mostram a dualidade das ações do zinco, dependendo do modelo e da concentração, provocando tanto respostas antioxidantes como pró-oxidantes.

Considerando nossos resultados em que os níveis de GSH-t foram determinados em córtex e hipocampo dos animais tratados *in vivo*, é possível que uma quantidade limitada de zinco possa atravessar a barreira hematoencefálica para atingir a concentração necessária para causar alteração de expressão de GSH. De acordo com Griffith (1999), a concentração intracelular de GSH reflete o balanço dinâmico entre a síntese de GSH, o consumo e a

perda através de seu transporte para o exterior da célula. O zinco, em várias linhagens de células de pulmão, pode aumentar o efluxo celular de GSH (Wilhelm *et al.*, 2001), um evento que poderia compensar um eventual (e paralelo) estímulo da síntese de GSH em resposta ao metal. Nesse sentido, um aumento na atividade de GPx observado no hipocampo frente aos tratamentos com zinco também poderia ter implicações relacionadas aos níveis de GSH-t, na medida em que poderia gerar uma maior quantidade de glutathione oxidada (GSSG) que, nesta forma, tem maior facilidade de sair da célula (Wilhelm *et al.*, 2001). Adicionalmente, o aumento na atividade de GST, também observado no hipocampo em resposta ao tratamento com ZnCl₂, poderia levar a uma maior conjugação de GSH com metabólitos, impedindo sua detecção. Em conjunto, estes efeitos poderiam mascarar a detecção de possíveis aumentos de GSH-t. Por fim, cabe salientar que, para proteger o organismo do dano oxidativo, não apenas os níveis de GSH-t são importantes, mas também a razão GSH/GSSG (Meister, 1994). Assim, estudos posteriores devem ser realizados para avaliar alterações na razão entre a GSH reduzida e oxidada em resposta aos tratamentos *in vivo* com ZnCl₂. Além disso, uma medida de GSH-t em fatias expostas *in vitro* com o metal também será importante para determinar possíveis diferenças de respostas frente à exposição ao metal *in vivo* e *in vitro*.

Nosso estudo demonstrou um aumento significativo na atividade da GPx e da GST no hipocampo, mas não no córtex cerebral, frente ao tratamento agudo ou com doses repetidas com ZnCl₂ e nas concentrações mais elevadas do metal. GPx possui um papel crucial na detoxificação de peróxidos, e sua atividade pode ser aumentada sob condições de estresse oxidativo associado à exposição a metais pesados (Flohé *et al.*, 1973; Rotruck *et al.*, 1973). Adicionalmente, a GST está normalmente envolvida na detoxificação de substâncias eletrofílicas pela sua conjugação com glutathione. Estes conjugados são,

posteriormente, metabolizados ou transportados para o meio extracelular. Além disto, a GST também tem atividade GPx, independente de selênio (Deneke & Fanburg, 1989).

Em um estudo realizado com ratos adultos tratados com ZnCl_2 5 mg/kg de forma aguda, a atividade das enzimas GST e GPx foram reduzidas significativamente no córtex cerebral, mas não foram afetadas no hipocampo (Brocardo *et al.*, 2005). Este dados com animais adultos contrastam com o aumento na GPx e GST no hipocampo de ratos jovens tratados com ZnCl_2 , sem nenhuma alteração no córtex cerebral. O efeito do zinco em animais adultos foi associado a um aumento na lipoperoxidação, determinada através da medida de TBARS (Brocardo *et al.*, 2005). Porém, em nosso estudo não foram detectadas alterações nos níveis de TBARS em nenhuma das doses de ZnCl_2 (dados preliminares não mostrados), sugerindo que, se houve lipoperoxidação, esta não pode ser detectada pelo método empregado.

Com base nesses dados, é interessante ressaltar que a barreira hematoencefálica do cérebro de animais em desenvolvimento possui uma maior permeabilidade a aminoácidos e proteínas quando comparada com a de animais adultos (Baños *et al.*, 1978; Braun *et al.*, 1980; Cornford *et al.*, 1982; Brenton & Gardiner, 1988). Isso, provavelmente, é reflexo do crescimento rápido do cérebro em desenvolvimento, resultando da necessidade de um influxo maior de aminoácidos para síntese de proteínas (Saunders *et al.*, 1999). Como o zinco atravessa a barreira hematoencefálica ligado a proteínas e aminoácidos, é possível que uma maior quantidade de zinco chegue ao cérebro em animais imaturos (8-14 dias) quando comparado com animais adultos. Com base nesta informação, poderíamos supor que animais jovens poderiam ter uma maior sensibilidade à exposição a metais, como o zinco, o que eventualmente levaria a uma alteração na atividade das enzimas antioxidantes ainda maior que em animais adultos. Uma das possibilidades seria a inibição da GR, como

demonstrado *in vitro* (Fig. 18; Mize & Langdon, 1962) ou em cultura de células (Wilhelm *et al.*, 2001). Entretanto, não foi observada a redução na atividade GR. Além disto, a atividade GST e GPx foram maiores no hipocampo de animais tratados com ZnCl₂. Frente a estes dados, pode-se supor que a capacidade de resposta frente ao insulto causado por zinco parece levar a um aumento compensatório na atividade destas duas enzimas antioxidantes.

Nossos resultados também demonstram a ausência de alteração nas defesas antioxidantes no córtex cerebral de ratos jovens tratados com zinco. Esses resultados contrastam com àqueles encontrados por Brocardo *et al.* (2005), onde houve uma redução na atividade de GST e GR nessa estrutura. No mesmo estudo, a atividade da GPx no córtex não foi alterada pelo tratamento com zinco. Esses resultados contrastantes indicam respostas diferenciadas das defesas antioxidantes entre ratos jovens e adultos.

Foi previamente demonstrado que o metabolismo aeróbico aumenta à medida que ocorre a maturação do cérebro de ratos (Booth *et al.*, 1980). Além disso, há um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio durante o processo de desenvolvimento, especialmente durante o período de mielinização e sinaptogênese, que ocorre em torno do 10º ao 14º dia após o nascimento (Khan & Black, 2003). A intensa proliferação de células gliais pode ser um dos principais responsáveis pelo aumento nas defesas antioxidantes neste período, uma vez que estas células possuem maiores níveis de glutathione e de enzimas antioxidantes do que neurônios (Rice & Russo-Menna, 1998). Sabe-se que há aumento das enzimas antioxidantes, tais como a GPx (Lindenau *et al.*, 1998; Rohrdanz *et al.*, 2001) e GST (Sharma *et al.*, 2005), em condições de estresse oxidativo. Além disto, vários trabalhos sugerem que o tratamento com ZnCl₂ causa aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e de radicais livres (Kim *et al.*, 1999b; Noh *et al.*, 1999; Noh & Koh,

2000). Baseado nestes dados supõe-se que o ZnCl_2 esteja causando estresse oxidativo. Entretanto, a confirmação desta possibilidade seria obtida através da análise dos danos oxidativos sobre proteínas, lipídeos e DNA, que poderia indicar de forma mais direta o possível papel pró-oxidante do ZnCl_2 .

A atividade da GR é essencial na manutenção da GSH na sua forma reduzida, e a inibição dessa enzima cria um desbalanço na taxa GSH/GSSG (Meister & Anderson, 1983; Stamler, 1994). Um dos resultados mais significativos apresentados no presente estudo foi a forte inibição dose-dependente *in vitro* da GR por ZnCl_2 em todas as concentrações utilizadas (10-100 μM), indicando que a atividade desta enzima é bastante sensível à inibição pelo zinco. A presença de ZnCl_2 30 μM causa uma inibição da GR de cerca de 50%. A inibição da GR pelo zinco *in vitro* tem sido documentada sobre a enzima purificada a partir de fígado de ratos (Mize & Langdon, 1962). Adicionalmente, uma forte inibição da GR também foi observada em células epiteliais pulmonares tratadas com o metal (Walther *et al.*, 2003).

O nosso estudo demonstrou a inibição da GR pelo ZnCl_2 em fatias de hipocampo. Neste modelo utilizando fatias hipocâmpais, é importante notar que se mantém a matriz extracelular natural, a conectividade neuronal e as interações neuro-gliais (Rodnight *et al.*, 1991; Gong *et al.*, 2001; Cordova *et al.*, 2004). Além disso, como não conhecemos a disponibilidade intracelular de zinco, pois as células dispõem de muitos mecanismos para imobilizar o metal, é possível que a concentração intracelular de zinco seja bem menor que as concentrações empregadas. Neste sentido, no tecido nervoso central homogeneizado foi observada a inibição de 50% da atividade da GR na presença de ZnCl_2 10 μM (dados não publicados). Baseado nestas observações é possível hipotetizar que a concentração

intracelular de ZnCl_2 ultrapassou 10 μM quando fatias de hipocampo foram tratadas com ZnCl_2 100 μM , tendo em vista a observação de que a atividade GR foi reduzida em ~75%.

As outras enzimas analisadas (GGT, GST e GPx) não tiveram suas atividades alteradas pela exposição *in vitro* das fatias a este metal. Portanto, o zinco mostrou, de forma inequívoca, uma inibição específica e dose-dependente da GR, mas não de outras enzimas antioxidantes. Como essa enzima possui resíduos tióis participando nos eventos catalíticos, uma possibilidade é de que o zinco possa ser quelado no sítio ativo da enzima (Mize & Langdon, 1962), impedindo sua interação com seus substratos.

Na avaliação da ação do zinco sobre a viabilidade celular em fatias hipocampais, nossos resultados demonstraram que o ZnCl_2 (100 μM), concentração atingida nas sinapses em condições patológicas (Haug *et al.*, 1971; Sloviter 1985; Frederickson *et al.*, 1988), diminui a viabilidade das células do hipocampo.

Uma de nossas hipóteses é a de que a inibição da GR seja um mecanismo envolvido nesta redução de viabilidade. A capacidade de degradar peróxidos via GPx requer GSH para fornecer os equivalentes redutores na degradação de peróxidos. Ao degradá-los, a GPx leva à formação de GSSG (Flohé *et al.*, 1973). Como a atividade da GR é necessária para a regeneração de GSH a partir de GSSG, e como ZnCl_2 100 μM causa redução da atividade de GR em ~75%, esperávamos que o tratamento das fatias com ZnCl_2 e o posterior tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 1 mM) causaria um efeito sinérgico em termos de prejuízo de viabilidade. Entretanto, o H_2O_2 1 mM não potencializou a redução de viabilidade causada por ZnCl_2 100 μM . De certa forma, nossos resultados sobre a viabilidade celular de fatias hipocampais na presença de ZnCl_2 e H_2O_2 estão de acordo com a idéia de que os níveis de GR estão acima do mínimo necessário para reduzir GSSG

(Jopperi-Davis *et al.*, 2004), ou que sistemas alternativos para redução de GSSG possam existir (Kanzok *et al.*, 2000). No trabalho de Jopperi-Davis *et al.* (2004), uma forte inibição da GR hepática por uma nitrosouréia levou a um modesto aumento nos níveis de GSSG. Por outro lado, os níveis de GSSG no fígado (~50 μM ; Shaik & Mehvar, 2006) são cerca de 25 vezes maiores do que no SNC (~2 μM ; Cooper & Kristal, 1997; Dafre *et al.*, 2003), indicando que o SNC possui alta eficiência na redução da GSSG.

Alem da GR, a catalase contribui para a detoxificação de H_2O_2 . Sob condições fisiológicas, a catalase aceita somente o H_2O_2 como substrato (e não peróxidos orgânicos), tendo uma ação efetiva na presença de altas concentrações desse composto (Aebi, 1984), o que minimizaria a necessidade do sistema dependente de GSH e GR. Embora a atividade específica da catalase seja muito menor no cérebro do que em tecidos como rim e fígado, esta enzima, mesmo assim, poderia ser importante no metabolismo de H_2O_2 no tecido nervoso. Dringen *et al.* (1999) demonstraram que os neurônios dependem da catalase para detoxificar H_2O_2 , uma vez que o sistema da glutathione possui uma eficácia reduzida nessas células, contrastando com astrócitos, onde a inibição da catalase demonstrou ser funcionalmente compensada pelo sistema da glutathione (Dringen & Hamprecht, 1997). Para testar esta possibilidade, seria importante avaliar a viabilidade celular na presença de peróxidos orgânicos, que não servem de substrato para a catalase, e a detoxificação de tais peróxidos dependeria, basicamente, do sistema da glutathione.

No presente estudo, foi observado que zinco (100 μM) estimulou a fosforilação de Akt (proteína cinase B) em fatias hipocâmpais expostas durante 2 h ao metal. Akt é uma proteína cinase conhecida por promover a sobrevivência celular através da fosforilação de diversos alvos, conduzindo à inibição de vias apoptóticas (Lizcano *et al.*, 2000, Masters *et*

al., 2001). Outros trabalhos também demonstraram o aumento de fosforilação e ativação da Akt pelo zinco, porém em cultura de fibroblastos e adipócitos (Tang & Shay, 2001), em cultura de células Swiss 3T3 (Kim *et al.*, 2000) e em linhagens de neuroblastoma (An *et al.*, 2005).

A PI3K estimula a produção de fosfoinositóis fosforilados na posição 3 (PI-3,4,5P), o que leva a ativação de proteínas quinases como PDK1, o qual fosforila Akt no resíduo de treonina 308. Além disso, outras cinases (de identidade ainda não bem estabelecida) também são ativadas neste processo e fosforilam um segundo resíduo, a Serina 473. A fosforilação dos dois resíduos é necessária para a plena ativação da Akt (Alessi *et al.*, 1996). Considerando estes aspectos na ativação de Akt, também analisamos se a ativação da Akt pelo zinco é dependente da via PI3K, utilizando o inibidor desta enzima, LY294002. Os resultados mostraram que a ação do zinco foi revertida aos níveis do controle na presença do inibidor.

A presença do LY294002 não diminuiu a viabilidade celular na presença do zinco na concentração de 100µM. Provavelmente essa concentração é muito tóxica, sobrepondo aos efeitos citoprotetores da Akt. Entretanto, deve ser considerado que o modelo utilizado em nosso trabalho é agudo, não sendo adequado para avaliação de eventos tardios como morte apoptótica ou sua proteção. Neste sentido, deve ser lembrado que a morte neuronal induzida pelo zinco exibe características de apoptose quando células em cultura são expostas a baixos níveis de toxicidade, passando a necrose quando há exposição a altos níveis de toxicidade (Kim *et al.*, 1999a; Lobner *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2000; Sensi *et al.*, 2000; Koh, 2001; Jiang *et al.*, 2001). Portanto, é possível que na presença de ZnCl₂ 100 µM as células estejam morrendo por necrose, processo independente da via de PI3K/Akt. Além disso, devemos considerar que, em modelos *in vitro* de cultura de células e modelos *in vivo*,

tem sido documentada a ação neuroprotetora de AKT relativa à morte celular que aparece mais tardiamente frente a excitotoxicidade ou isquemia (Dhandapani *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Desta forma, a ativação de AKT pelo zinco poderia ser um evento importante para neuroproteção frente à morte que pode aparecer mais tardiamente (12 ou 24h). Além do aspecto relacionado à neuroproteção, deve também ser considerado que a via PI3K/AKT também está envolvida na modulação de fenômenos de neuroplasticidade como LTD e LTP (Hou & Klann, 2004; van der Heide *et al.*, 2005). Em conjunto, nossos dados e outras observações da literatura, reforçam a possível dualidade de efeitos do zinco. Apesar da necessidade de mais estudos para determinar as ações do zinco na modulação de vias de sinalização, e as implicações deste processo na sobrevivência ou morte celular no modelo de fatais, salienta-se que nossos resultados trazem dados inéditos no que se refere aos possíveis alvos moleculares do zinco nas sinapses hipocâmpais, onde este metal é fisiologicamente abundante.

A fosforilação de resíduos de tirosina em receptores para fatores neurotróficos é fundamental na ativação de uma cascata de eventos, que culmina com a ativação de Akt e MAPKs (Guyton *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001). Os níveis de fosforilação sobre resíduos de tirosina são regulados por atividades enzimáticas opostas que fosforilam (tirosina cinases) e defosforilam (tirosina fosfatases) esses resíduos (Sun & Tonks, 1994; Hunter, 1995). Desta forma, tanto a ativação da cinase como a inibição da fosfatase podem conduzir a um aumento de fosforilação sobre as proteínas alvo (Hunter, 1995; Lee *et al.*, 1998; Cortizo & Etcheverry, 1995; Bae *et al.*, 1997; Leal *et al.*, 2002). Inclusive a inibição transitória de tirosinas fosfatases tem um papel crítico na sinalização celular (Lee *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 1997). Considerando os possíveis mecanismos envolvidos na ativação de

AKT pelo zinco, deve ser salientado que este metal é um reconhecido inibidor de proteínas tirosinas fosfatases. Neste sentido, um mecanismo de inibição direta, onde o zinco bloqueia a atividade dessas proteínas pela ligação à cisteína catalítica e a resíduos de histidina ou aspartato vizinhos presentes no sítio ativo destas enzimas, foi recentemente proposto (Haase & Maret, 2003). Samet *et al.* (1999) observaram esse efeito inibitório das proteínas tirosinas fosfatases em cultura de células BEAS S6 expostas por 60 minutos ao zinco. Devido ao potente efeito inibitório do zinco sobre a atividade das tirosinas fosfatases, é possível que esse metal facilite a ativação dos receptores e conduza ao aumento da ativação da via PI3K/AKT, como observado neste estudo, bem como das vias de MAPKs, observada em estudos prévios em nosso grupo.

Em conjunto, nosso estudo demonstra que o zinco *in vivo* pode promover aumento das defesas antioxidantes em hipocampo de ratos jovens. Por outro lado, o zinco *in vitro*, na concentração de 100 μ M, pode inibir a enzima glutathione redutase, ativar AKT via PI3K, e produzir neurotoxicidade em fatias hipocâmpais de animais imaturos. Estes dados mostram evidências de neurotoxicidade causada pelo metal juntamente com a ativação de eventos bioquímicos reconhecidos como neuroprotetores.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

Experimentos *in vivo*:

1- O tratamento dos animais jovens *in vivo* com zinco (administrando doses repetidas ou agudas) não alterou os níveis de glutathione total tanto no córtex cerebral quanto no hipocampo.

2 - O tratamento dos animais jovens *in vivo* com zinco (administrando doses repetidas ou agudas) e nas doses mais elevadas do metal (4 ou 16 mg/Kg), estimulou a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GST no hipocampo. Esse efeito não foi observado na atividade das outras enzimas testadas, como a GR e catalase. A atividade das mesmas enzimas analisadas no córtex cerebral desses animais não demonstrou alteração em resposta a nenhum dos tratamentos com zinco.

Experimentos *in vitro*:

3 - Em fatias de hipocampo de ratos jovens, a enzima GR foi inibida na presença de zinco em todas as concentrações testadas (10 a 300 μ M). Além disso, o efeito inibitório do zinco é específico sobre esta enzima, uma vez que os perfis de atividade de outras enzimas analisadas (GGT, GST e GPx) não foram alterados.

4 - A exposição de fatias de hipocampo ao ZnCl_2 (100 e 300 μM) por 2 horas causou uma diminuição significativa na viabilidade celular, medida pela redução do MTT.

5 – Apesar da inibição de GR pelo zinco, não houve sinergismo significativo entre o pré-tratamento com ZnCl_2 e o tratamento com H_2O_2 . Isso sugere que, nas fatias hipocampais, as células possivelmente podem utilizar outros meios para detoxificar o H_2O_2 .

6 - A exposição das fatias hipocampais ao zinco causou um aumento na fosforilação da Akt observado somente na concentração de 100 μM .

7 - O tratamento das fatias com o inibidor da PI3K, LY294002, reverteu a fosforilação zinco-dependente de Akt, indicando que a ação do zinco na fosforilação da Akt ocorre através da via PI3K.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K. & SAITO, H. (1998). Characterization of t-butyl hydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurones and astrocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 83, 40–6.
- ADAMS, S.; GREEN, P.; CLAXTON, R.; SIMCOX, S.; WILLIAMS, M.V.; WALSH, K. & LEEUWENBURGH, C. (2001). Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Front. Biosci.* 6, A17–A24.
- AEBI, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–6.
- AHN, Y. H.; KIM, Y. H., HONG, S. H. & KOH, J. Y. (1998). Depletion of intracellular zinc induces protein synthesis-dependent neuronal apoptosis in mouse cortical culture. *Exp. Neurol.* 154, 47–56.
- AKERBOOM, T. P. & SIES, H. (1981). Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–82.
- ALESSI, D. R.; ANDJELKOVIC, M.; CAUDWELL, B.; CRON, P.; MORRICE, N.; COHEN, P. & HEMMINGS, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15(23), 6541–51.
- ALTOMARE, D. A., GUO, K., CHENG, J. Q., SONODA, G., WALSH, K. & TESTA, J. R. 1995. Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene.* 11, 1055–60.
- AN, W. L.; PEI, J. J.; NISHIMURA, T.; WINBLAD, B. & COWBURN, R. F. (2005). Zinc-induced anti-apoptotic effects in SH-SY5Y neuroblastoma cells via the extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 135(1-2), 40–7.
- ANDERSEN, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 10, S18–25.
- ANDJELKOVIC, M.; ALESSI, D. R.; MEIER, R.; FERNANDEZ, A.; LAMB, N. J.; FRECH, M.; CRON, P.; COHEN, P.; LUCOCQ, J. M. & HEMMINGS, B. A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 272, 31515–24.
- ANIKSZTEJN, L.; CHARTON, G. & BEN-ARI, Y. (1987). Selective release of endogenous zinc from the hippocampal mossy fibers in situ. *Brain Res.* 404, 58–64.
- ASSAF, S. Y. & CHUNG, S. H. (1984). Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature.* 308, 734–6.

- ATAR, D.; BACKX, P. H.; APPEL, M. M.; GAO, W. D. & MARBAN, E. (1995). Excitation-transcription coupling mediated by zinc influx through voltage-dependent calcium channels. *J. Biol. Chem.* 270, 2473–7.
- BAE, Y. S.; KANG, S. W.; SEO, M. S.; BAINES, I. C.; TEKLE, E.; CHOCK, P. B. & RHEE, S. G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide: role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272:217–21.
- BAÑOS, G.; DANIEL, P. M. & PRATT, O. E. (1978). The effect of age upon the entry of some amino acids into the brain, their incorporation into cerebral protein. *Dev. Med. Child Neurol.* 20, 355–46.
- BARANANO, D. E.; FERRIS, C. D. & SNYDER, S. H. (2001). Atypical neural messengers. *Trends Neurosci.* 24, 99–106.
- BELLACOSA, A.; CHAN, T. O.; AHMED, N. N.; DATTA, K.; MALSTROM, S.; STOKOE, D.; MCCORMICK, F.; FENG, J. & TSICHLIS, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene.* 17, 313–25.
- BEN-YOSEPH, O.; BOXER, P. A. & ROSS, B. D. (1996). Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J. Neurochem.* 66, 2329–37.
- BEYERSMANN, D. & HAASE, H. (2001). Function of zinc in signalling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals.* 14, 331–41.
- BHARATH, S.; HSU, M.; KAUR, D. RAJAGOPALAN, S. & ANDERSEN, J. K. (2002). Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1037–48.
- BOLAÑOS, J. P.; HEALES, S. J. R.; LAND, J. M. & CLARK, J. B. (1995). Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J. Neurochem.* 64, 1965–72.
- BOOTH, R. F.; PATEL, T. B. & CLARK, J. B. (1980). The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (guinea pig) and non-precocial (rat) species. *J. Neurochem.* 34, 17–25.
- BORG, J. & LONDON, J. (2002). Copper/zinc superoxide dismutase overexpression promotes survival of cortical neurons exposed to neurotoxins in vitro. *J. Neurosci. Res.* 70, 180–9.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–54.
- BRAUN, L. D.; CORNFORD, E. M. & OLDENDORF, W. H. (1980). Newborn rabbit blood-brain barrier is selectively permeable and differs substantially from the adult. *J. Neurochem.* 34, 147–52.
- BRAZIL, D. P.; YANG, Z. Z. & HEMMINGS, B. A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *TIBS.* 29(5), 233–42.

- BRENTON, D. P. & GARDINER, R. M. (1988). Transport of L-phenylalanine and related aminoacids at the ovine blood-brain barrier. *J. Physiol.* 402, 497-514.
- BROCARD, P. S.; PANDOLFO, P.; TAKAHASHI, R. N.; RODRIGUES, A. L. S. & DAFRE, A. L. (2005). Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology.* 207, 283-91.
- CAMBIER, D.; RUTIN, J.; ALLIOT, F. & PESSAC, B. (2000). Expression of g-glutamyl transpeptidase in mouse perivascular astrocytes and in a protoplasmic-like astroglial cell clone. *Brain Res.* 852, 191-7.
- CARLBERG, I. & MANNERVIK, B. 1985. Glutathione reductase. *Meth. Enzymol.* 113, 484-9.
- CERUTTI, P. A. (1994). Oxy-radicals and cancer. *Lancet.* 334, 862-3.
- CHEN, C. J. & LIAO, S. L. (2003). Zinc toxicity on neonatal cortical neurons: involvement of glutathione chelation. *Journal of Neurochemistry.* 85, 443-53.
- CHEN, Y.; MIAO, Z. H. & DING, J. (2004). The emergent role of p38 MAPKs in the regulation of cell cycle. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan.* 35(4), 315-20.
- CHOI, D. W. & KOH, J. Y. (1998). Zinc and brain injury. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 347-75.
- CHONG, Z. Z.; LI, F. & MAIESE, K. (2005). Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol. Histopathol.* 20, 299-315.
- CHONG, Z. Z.; KANG, J. Q. & MAIESE, K. (2003). Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *Br. J. Pharmacol.* 138, 1107-18.
- COLE, T. B.; WENZEL, H. J.; KAUFER, K. E.; SCHWARTZKROIN, P. A. & PALMITER, R. D. (1999). Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1716-21.
- COLVIN, R. A.; FONTAINE, C. P.; LASKOWSKI, M. & THOMAS, D. (2003). Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 479(1-3), 171-85.
- COMPORTI, M. (1989). Three models of free radical-induced cell injury. *Chem. Biol. Interact.* 72, 51-6.
- CONERY, A. R.; CAO, Y.; THOMPSON, E. A.; TOWNSEND JR.; C. M.; KO, T. C. & LUO, K. (2004). Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 6, 366-72.
- CORNFORD, E. M.; BRAUN, L. D. & OLDENDORF, W. H. (1982). Developmental modulation of blood-brain barrier permeability as an indicator of changing nutritional requirements in the brain. *Pediatr. Res.* 16, 324-8.

- COOPER, A. J. L. (1997). Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In: Rosenberg, R. N.; Prusiner, S. B.; DiMauro, S.; Barchi, R. L.; Kunk, L. M. (eds.), *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*. Boston: Butterworth-Heinemann. 1195–230.
- COOPER, A. J. L. & KRISTAL, B. S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* 378(8), 793-802.
- CORDOVA, F. M.; RODRIGUES, A. L. S.; GIACOMELLI, M. B. O.; OLIVEIRA, C. S.; POSSER, T.; DUNLEY, P. R. & LEAL, R. B. (2004). Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Research*. 998, 65-72.
- CORTIZO, A. M. & ETCHEVERRY, S. B. (1995). Vanadium derivatives act as growth factor—mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 145, 97–102.
- CRACK, P. J.; TAYLOR, J. M.; FLENTJAR, N. J.; DE HAAN, J.; HERTZOG, P.; IANNELLO, R. C. & KOLA, I. (2001). Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J. Neurochem.* 78, 1389–99.
- CRAWFORD, I. L. & CONNOR, J. D. (1973). Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fiber pathway. *Nature*. 244, 422–3.
- CROSSTHWAITE, A. J.; HASAN, S. & WILLIAMS, R. J. (2002). Hydrogen peroxidemediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca²⁺ and PI3-kinase. *J. Neurochem.* 80, 24–35.
- CROWDER, R. J. & FREEMAN, R. S. (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18, 2933–43.
- CUAJUNGO, M. P. & LEES, G. J. (1997). Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.* 4, 137–69.
- DAFRE, A. L.; ARTENI, N. S.; SIQUEIRA, I. R. & NETTO, C. A. (2003). Perturbations in the thiol homeostasis following neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* 345(1), 65-8.
- DATTA, S. R.; BRUNET, A. & GREENBERG, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905–27.
- DATTA, S. R.; DUDEK, H.; TAO, X.; MASTERS, S.; FU, H.; GOTOH, Y. & GREENBERG, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91, 231–41.
- DAVIS, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 103, 239–52.
- DENEKE, S. M. & FANBURG, B. L. (1989). Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.* 257, 163–73.

- DHANDAPANI, K. M.; WADE, F. M.; WAKADE, C.; MAHESH, V. B. & BRANN, D. W. (2005). Neuroprotection by stem cell factor in rat cortical neurons involves AKT and NFκB. *J. Neurochem.* 95, 9–19.
- DINELEY, K. E.; VOTYAKOVA, T. V. & REYNOLDS, I. J. (2003). Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 85, 563–70.
- DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P. G.; HIRRLINGER, J. (2005). Peroxide Detoxification by Brain Cells. *J. Neurosci. Res.* 79, 157–65.
- DRINGEN, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology.* 62, 649–71.
- DRINGEN, R.; PFEIFFER, B. & HAMPRECHT, B. (1999). Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursors for neuronal glutathione. *J. Neurosci.* 19(1), 562–9.
- DRINGEN, R. & HAMPRECHT, B. (1997). Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res.* 759, 67–75.
- DUDEK, H.; DATTA, S. R.; FRANKE, T. F.; BIRNBAUM, M. J.; YAO, R.; COOPER, G. M.; SEGAL, R. A.; KAPLAN, D. R. & GREENBERG, M. E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine–threonine protein kinase Akt. *Science.* 275, 661–5.
- EOM, S. J.; KIM, E. Y.; LEE, J. E.; KANG, H. J.; SHIM, J.; KIM, S. U.; GWAG, B. J. & CHOI, E. J. (2001). Zn(2+) induces stimulation of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway through phosphoinositide 3-Kinase. *Mol. Pharmacol.* 59(5), 981–6.
- FARBER, J. L.; KYLE, M. M.; COLEMAN, J. B. (1990). Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 62, 670–8.
- FINKEL, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 248–53.
- FLENTJAR, N. J.; CRACK, P. J.; BOYD, R.; MALIN, M.; DE HAAN, J. B.; HERTZOG, P.; KOLA, I.; IANNELLO, R. (2002). Mice lacking glutathione peroxidase-1 activity show increased TUNEL staining and an accelerated inflammatory response in brain following a cold-induced injury. *Exp. Neurol.* 177, 9 – 20.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. & SCHOCK, H. H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132–4.
- FRECH, M.; ANDJELKOVIC, M.; INGLE, E.; REDDY, K. K.; FALCK, J. R. & HEMMINGS, B. A. (1997). High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 8474–81.

- FREDERICKSON, C. J.; KOH, J. Y. & BUSH, A. I. (2005). The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6(6), 449-62.
- FREDERICKSON, C. J.; MARET, W. & CUAJUNGCO, M. P. (2004). Zinc and excitotoxic brain injury: a new model. *Neuroscientist*. 10(1), 18-25.
- FREDERICKSON, C. J. & BUSH, A. I. (2001). Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. *Biometals*. 14, 353-66.
- FREDERICKSON, C. J.; SUH, S. W.; SILVA, D. & THOMPSON, R. B. (2000). Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J. Nutr.* 130, 1471S-1483S.
- FREDERICKSON, C. J. & MONCRIEFF, D. W. (1994). Zinc-containing neurons. *Biol. Signals*. 3, 127-39.
- FREDERICKSON, C. J. (1989). Neurobiology of zinc and zinc containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 31, 145-238.
- FREDERICKSON, C. J.; HERNANDEZ, M. D. & MCGUINTY, J. F. (1989). Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res.* 480, 317-21.
- FREDERICKSON, C. J.; HERNANDEZ, M. D.; GOIK, S. A.; MORTON, J. D. & MCGINTY, J. F. (1988). Loss of zinc staining from hippocampal mossy fibers during kainic acid induced seizures: a histofluorescence study. *Brain Res.* 446, 383-6.
- FRIEDLICH, A. L.; LEE, J. Y.; VAN GROEN, T.; CHERNY, R. A.; VOLITAKIS, I.; COLE, T. B.; PALMITER, R. D.; KOH, J. Y. & BUSH, A. I. 2004. Neuronal zinc exchange with the blood vessel wall promotes cerebral amyloid angiopathy in an animal model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24, 3453-3459.
- FUJII, T.; HAMAOKA, R.; FUJII, J. & TANIGUCHI, N. (2000). Redox capacity of cells affects inactivation of glutathione reductase by nitrosative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 123-30.
- GALARIS, D. & EVANGELOU, A. (2002). The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 42, 93-103.
- GAZARYAN, I. G.; KRASNIKOV, B. F.; ASHBY, G. A.; THORNELEY, R. N.; KRISTAL, B. S. & BROWN, A. M. (2002). Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 277(12), 10064-72.
- GONG, C. X.; LIDSKY, T.; WEGIEL, J.; GRUNDKE-IQBAL, I. & IQBAL, K. (2001). Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 6(3), 134-40.
- GREENGARD, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science*. 294, 1024-30.
- GRIFFITH, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 922-35.

- GRIFFITH, O. W. (1981). The role of glutathione turnover in the apparent renal secretion of cystine. *J. Biol. Chem.* 256(23), 12263-8.
- GUYTON, K. Z.; GOROSPE, M.; KENSLER, T. W. & HOLBROOK, N. J. (1996). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by butylated hydroxytoluene hydroperoxide: implications for cellular survival and tumor promotion. *Cancer Res.* 56(15), 3480-5.
- HA, K. N.; CHEN, Y.; CAI, J. & STERNBERG, P. J. (2006). Increased glutathione synthesis through an ARE-Nrf2-dependent pathway by zinc in the RPE: implication for protection against oxidative stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47(6), 2709-15.
- HAASE, H. & MARET, W. (2003). Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Exp. Cell. Res.* 291(2), 289-98.
- HABIG, W. H. & JAKOBY, W. B. (1981). Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77, 218-31.
- HADDAD, J. J. & HARB, H. L. (2005) l- γ -Glutamyl-l-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Molecular Immunology.* 42, 987-1014
- HALLIWELL, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs Aging.* 9, 685-716.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press.* 3^a. Ed.
- HALLIWELL, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59, 1609-23.
- HANADA, M.; FENG, J. & HEMMINGS, B. A. (2004). Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Bioch. Biophys. Acta.* 1697, 3 – 16.
- HAUG, F. M.; BLACKSTAD, T. W.; SIMONSEN, A. H. & ZIMMER, J. (1971). Timm's sulfide silver reaction for zinc during experimental anterograde degeneration of hippocampal mossy fibers. *J. Comp. Neurol.* 142, 23-31.
- HAUG, F. M. (1967). Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie.* 8, 355-68.
- HENRY, M. K.; LYNCH, J. T.; EAPEN, A. K. & QUELLE, F. W. (2001). DNA damage induced cell-cycle arrest of hematopoietic cells is overridden by activation of the PI-3 kinase/Akt signaling pathway. *Blood.* 98, 834-41.
- HERBERT, V.; SHAW, S.; JAYATILLEKE, E. & STOPLER-KASDAN, T. 1994. Most free radical injury is iron-related: it is promoted by iron, hemin, holoferritin and Vitamin C, and inhibited by desferoxamine and apoferritin. *Stem Cells.* 12, 289-303.

- HO, Y. S.; MAGNENAT, J. L.; GARGANO, M. & CAO, J. (1998). The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environ. Health Perspect.* 106, 1219–28.
- HOU, L. & KLANN, E. (2004). Activation of the Phosphoinositide 3-Kinase–Akt–Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Is Required for Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression. *J. Neurosci.* 24(28), 6352–61.
- HOWELL, G. A.; WELCH, M. G. & FREDRICKSON, C. J. (1984). Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature.* 308, 736–8.
- HUNTER, T. (2000). Signaling – 2000 and beyond. *Cell.* 100, 113–27.
- HUNTER, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 80, 225–36.
- HWANG, C.; SINSKEY, A. J. & LODISH, H. F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science.* 257(5076), 1496–502.
- JAISWAL, A. K. (2004). Regulation of antioxidant response element-dependent induction of detoxifying enzyme synthesis. *Methods Enzymol.* 378, 221–38.
- JIANG, D.; SULLIVAN, P. G.; SENSI, S. L.; STEWARD, O. & WEISS, J. H. (2001). Zn(2+) induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276(50), 47524–9.
- JOHNSON, J. A.; BARBARY, A. E.; KORNGUTH, S. E.; BRUGGE, J. F.; SIEGEL, F. L. (1993). Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia. *J. Neurosci.* 73(5), 2013–23.
- JOPPERI-DAVIS, K. S.; PARK, M. S.; ROGERS, L. K.; BACKES JR., C. H.; LIMC, I. K. & SMITH, C. V. (2004). Compartmental inhibition of hepatic glutathione reductase activities by 1,3-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea (BCNU) in Sprague–Dawley and Fischer-344 rats. *Toxicology Letters.* 147, 219–28.
- KANG, J. Q., CHONG, Z. Z. & MAIESE, K. (2003a). Akt1 protects against inflammatory microglial activation through maintenance of membrane asymmetry and modulation of cysteine protease activity. *J. Neurosci. Res.* 74, 37–51.
- KANG, J. Q., CHONG, Z. Z. & MAIESE, K. (2003b). Critical role for Akt1 in the modulation of apoptotic phosphatidylserine exposure and microglial activation. *Mol. Pharmacol.* 64, 557–69.
- KANZOK, S. M.; FECHNER, A.; BAUER, H.; ULSCHMID, J. K.; MULLER, H. M.; BOTELLA-MUNOZ, J.; SCHNEUWLY, S.; SCHIRMER, R. H. & BECKER, K. (2001). Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science.* 291(5504), 643–6.
- KEELING, P. L. & SMITH, L. L. (1982). Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3243–9.

- KERCHNER, G. A.; CANZONIERO, L. M.; YU, S. P.; LING, C. & CHOI, D. W. (2000). Zn^{2+} current is mediated by voltage-gated Ca^{2+} channels and enhanced by extracellular acidity in mouse cortical neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 528, 39–52.
- KETTERER, B.; MEYER, D. J. & CLARK, A. G. (1988). Soluble glutathione transferase isozymes. In: Glutathione conjugation: mechanism and biological significance. (Sies H, Ketterer B, eds), pp 73-135. London: Academic.
- KETTERER, B.; COLES, B. & MEYER, O. J. (1983). The role of glutathione in detoxification. *Envir. Health. Persp.* 49, 59–69.
- KHAN, J. Y. & BLACK, S. M. (2003). Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediatr. Res.* 54, 77–82.
- KIM, S.; JUNG, Y.; KIM, D.; KOH, H. & CHUNG, J. (2000). Extracellular zinc activates p70S6 kinase through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 25979–84.
- KIM, E. Y.; KOH, J. Y.; KIM, Y. H.; SOHN, S.; JOE, E. & GWAG, B. J. (1999a). Zn^{2+} entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell cultures. *Eur. J. Neurosci.* 11, 327–34.
- KIM, Y. H.; KIM, E. Y.; GWAG, B. J.; SOHN, S. & KOH, J. Y. (1999b). Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience.* 89, 175–182.
- KOH, J. Y. (2001). Zinc and disease of the brain. *Mol. Neurobiol.* 24, 99–106.
- KOH, J. Y.; SUH, S. W.; GWAG, B. J.; HE, Y. Y.; HSU, C. Y. & CHOI, D. W. (1996). The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science.* 272, 1013–6.
- KOH, J. Y. & CHOI, D. W. (1994). Zinc toxicity on cultured cortical neurons: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience.* 60, 1049–57.
- KOHN, A. D.; SUMMERS, S. A.; BIRNBAUM, M. J. & ROTH, R. A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulated glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271, 31372–8.
- KOHN, A. D.; KOVACINA, K. S. & ROTH, R. A. (1995). Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing Ser/Thr kinase. *EMBO J.* 14, 4288–95.
- KWAK, M. K.; WAKABAYASHI, N. & KENSLER, T. W. (2004). Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res.* 555, 133–48.
- LAU, L. F. & HUGANIR, R. L. (2006). Tyrosine phosphorylation. *Basic Neurochemistry*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 391–433.
- LAU, L. F. & HUGANIR, R. L. (1999). Tyrosine phosphorylation. *Basic Neurochemistry*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 497–522.

- LAWLOR, M. A. & ALESSI, D. R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* 114, 2903–10.
- LEAL, R. B.; CORDOVA, F. M.; HERD, L.; BOBROVSKAYA, L. & DUNKLEY, P. R. (2002). Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 178(1), 44–51.
- LEE, J. M.; ZIPFEL, G. J.; PARK, K. H.; HE, Y. Y.; HSU, C. Y. & CHOI, D. W. (2002). Zinc translocation accelerates infarction after mild transient focal ischemia. *Neuroscience*. 115, 871–8.
- LEE, S. R.; KWON, K. S.; KIM, S. R. & RHEE, S. G. (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 15366–72.
- LEVIN, E. D.; BRADY, T. C.; HOCHREIN, E. C.; OURY, T. D.; JONSSON, L. M.; MARKLUND, S. L. & CRAPO, J. D. (1998). Molecular manipulations of extracellular superoxide dismutase: functional importance for learning. *Behav. Genet.* 28, 381–90.
- LI, Y.; HOUGH, C. J.; FREDERICKSON, C. J. & SARVEY, J. M. (2001a). Induction of mossy fiber→Ca3 long-term potentiation requires translocation of synaptically released Zn^{2+} . *J. Neurosci.* 21, 8015–25.
- LI, Y.; HOUGH, C. J.; SUH, S. W.; SARVEY, J. M. & FREDERICKSON, C. J. (2001b). Rapid translocation of Zn^{2+} from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons following physiological stimulation. *J. Neurophysiol.* 86(5), 2597–604.
- LINDENAU, J.; NOACK, H.; ASAYAMA, K. & WOLF, G. (1998). Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia*. 24(2), 252–6.
- LIOCHEV, S. I. & FRIDOVICH, I. (1999). Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life*. 48, 157–61.
- LITTLE, C. & O'BRIEN, P. J. (1968). An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxidase substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 145–50.
- LIU, K. Z.; SCHULTZ, C. P.; JOHNSTON, J. B.; LEE, K. & MANTSCH, H. H. (1997). Comparison of infrared spectra of CLL cells with their ex vivo sensitivity (MTT assay) to chlorambucil and cladribine. *Leuk. Res.* 21(11-12), 1125–33.
- LIZCANO, J. M.; MORRICE, N. & COHEN, P. (2000). Regulation of BAD by cAMPdependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site. *Biochem. J.* 349, 547–57.
- LOBNER, D.; CANZONIERO, L. M. T.; , GOTTRON, F.; YING, H.; KNUDSON, C. M.; TIAN, M.; DUGAN, L. L.; KORSMEYER, S. J.; KERCHNER, G. A. & CHOI, D. W. (2000). Zinc-induced neuronal death in cortical neurons. *Cell and Mol. Biol.* 46797–806.
- MANEV, H.; KHARLAMOV, E.; UZ, T.; MASON, R. P. & CAGNOLI, C. M. (1997). Characterization of zinc-induced neuronal death in primary cultures of rat cerebellar granule cells. *Experimental Neurology*. 146, 171–8.

- MANNERVIK, B. & DANIELSON, U. H. (1988). Glutathione transferases- structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283-337.
- MARIN, P.; ISRAEL, M.; GLOWINSKI, J. & PREMONT, J. (2000). Routes of zinc entry in mouse cortical neurons: role in zinc induced neurotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* 12, 8-18.
- MARKLUND, S. L. (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.* 222, 649-55.
- MARKS, D. B.; MARKS, A. D. & SMITH, C. M. (1996). Oxygen metabolism and toxicity. In: *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. Baltimore: Williams and Wilkins. 327-40.
- MARTINDALE, J. L. & HOLBROOK, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1-15.
- MASTERS, S. C.; YANG, H.; DATTA, S. R.; GREENBERG, M. E. & FU, H. (2001). 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol. Pharmacol.* 60, 1325-31.
- MATSUZAKI, H.; TAMATANI, M.; MITSUDA, N.; NAMIKAWA, K.; KIYAMA, H.; MIYAKE, S. & TOHYAMA, M. (1999). Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 73, 2037-46.
- MEIER, R.; ALESSI, D. R.; CRON, P.; ANDJELKOVIC, M. & HEMMINGS, B. A. (1997). Mitogenic activation, phosphorylation and nuclear translocation of protein kinase B β . *J. Biol. Chem.* 272, 30491-97.
- MEYER, D. J.; COLES, B.; PEMBLE, S. E.; GILMORE, K. S.; FRASER, G. M. & KETTERER, B. (1991). Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and human. *Biochem. J.* 274, 409-14.
- MEISTER, A. (1994). Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res.* 54, 1969s-75s.
- MEISTER, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science.* 220, 472-7.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-60.
- MEISTER, A.; TATE, S. S. & GRIFFITH, O. W. (1981). γ -Glutamyltranspeptidase. *Methods Enzymol.* 77, 237-53.
- MIZE, C. E. & LANGDON, R. G. 1962. Hepatic glutathione reductase. I. Purification and general kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 237, 1589-95.
- MOCCHIGIANI, E.; BERTONI-FREDDARI, C.; MARCELLINI, F. & MALAVOLTA, M. (2005). Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog. Neurobiol.* 75, 367-90.
- MOLNAR, P. & NADLER, J. V. (2001). Synaptically-released zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses. *Brain Res.* 910, 205-207.

- MOSIALOU, E.; EKSTROM, G.; ADANG, A. E. P. & MORGENSTERN, R. (1993). Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 45, 1645–51.
- MURPHY, L. O. & BLENIS, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *TIBS*. 31(5), 268–75.
- NESTLER, E. J. & GREENGARD, P. (1999). Serine and threonine phosphorylation. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 472–5. Raven, Philadelphia.
- NOH, K. M. & KOH, J. Y. (2000). Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 20:RC111.
- NOH, K. M.; KIM, Y. H. & KOH, J. Y. (1999). Mediation by membrane protein kinase C of zinc-induced oxidative neuronal injury in mouse cortical cultures. *J. Neurochem.* 72, 1609–16.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N. & YAGI, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95(2), 351–8.
- OTEIZA, P. I.; MACKENZIE, G. G. & VERSTRAETEN, S. V. (2004). Metals in neurodegeneration: involvement of oxidants and oxidant-sensitive transcription factors. *Mol. Aspects Med.* 25, 103–15.
- OURY, T. D.; DAY, B. J. & CRAPO, J. D. (1996). Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab. Invest.* 75, 617–36.
- PAOLETTI, P.; ASCHER, P. & NEYTON, J. (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J. Neurosci.* 17, 5711–25.
- PAWSON, T. & SCOTT, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*. 278(5346), 2075–80.
- PEREZ-CLAUSELL, J. & DANSHER, G. (1985). Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Res.* 337, 91–8.
- PETERSON, R. T. & SCHREIBER, S. L. (1999). Kinase phosphorylation: keeping it all in the family. *Curr. Biol.* 9, R521–4.
- PETERSON, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83(2), 346–56.
- PRASAD, N.; TOPPING, R. S.; ZHOU, D. & DECKER, S. J. (2000). Oxidative stress and vanadate induce tyrosine phosphorylation of phosphoinositide-dependent kinase 1 (PKD1). *Biochemistry*. 39, 6929–35.
- PUTTAPARTHI, K.; GITOMER, W. L.; KRISHNAN, U.; SON, M.; RAJENDRAN, B. & ELLIOTT JL. 2002. Disease progression in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis is dependent on both neuronal and non-neuronal zinc binding proteins. *J. Neurosci.* 22, 8790–8796.

- RAPS, S. P.; LAI, J. C. K.; HERTZ, L. & COOPER, A. J. L. (1989). Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res.* 493, 398–401.
- RICE, M. E. & RUSSO-MENNA, I. (1998). Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neurosci.* 82(4), 1213-23.
- ROBINSON, M. J. & COBB, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinases pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180–6.
- RODNIGHT, R.; GONÇALVES, C. A.; LEAL, R.; ROCHA, E.; SALBEGO, C. G.; WOFCHUK, S. T. (1991). Regional distribution and properties of an enzyme system in rat brain that phosphorylates ppH-47, an insoluble protein highly labelled in tissue slices from the hippocampus. *Prog. Brain Res.* 89, 157-67
- ROHRDANZ, E.; SCHMUCK, G.; OHLER, S.; TRAN-THI, Q. H. & KAHL, R. (2001). Changes in antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide in rat astroglial cells. *Arch. Toxicol.* 75, 150–8.
- ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B.; HAFEMAN, D. G. & HOEKSTRA, W. G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179, 588–90.
- SALINAS, M.; DIAZ, R.; ABRAHAM, N. G.; RUIZ DE GALARRETA, C. M. & CUADRADO, A. (2003). Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 278, 13898–904.
- SAMET, J. M.; SILBAJORIS, R.; WU, W. & GRAVES, L. M. (1999). Tyrosine phosphatases as targets in metal-induced signaling in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21(3), 357-64.
- SAUNDERS, N. R.; HABGOOD, M. D. & DZIEGIELEWSKA, K. M. (1999). Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 85-91.
- SCHILLACE, R. V. & SCOTT, J. D. (1999). Association of the type 1 protein phosphatase PP1 with the A-kinase anchoring protein AKAP220. *Curr. Biol. Mar.* 9(6), 321-4.
- SENSI, S. L.; YIN, H. Z. & WEISS, J. H. (2000). AMPA/kainite receptor-triggered Zn^{2+} entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn^{2+} uptake and persistent mitochondrial dysfunction. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3813–8.
- SENSI, S. L.; YIN, H. Z. & WEISS, J. H. (1999a). Glutamate triggers preferential Zn^{2+} flux through Ca^{2+} -permeable AMPA channels and consequent ROS production. *Neuroreport* 10, 1723–27.

- SENSI, S. L.; YIN, H. Z.; CARRIEDO, S. G.; RAO, S. S. & WEISS, J. H. (1999b). Preferential Zn^{2+} influx through Ca^{2+} permeable AMPA/kainite channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2414–9.
- SHAIK, I. H.; MEHVAR, R. (2006). Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. *Anal Bioanal Chem.* 385(1), 105-13.
- SHARMA, Y.; BASHIR, S.; IRSHAD, M.; NAG, T. C. & DOGRA, T. D. (2005). Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology.* 215(3), 173-81.
- SIES, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27(9-10), 916-21.
- SIES, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–5.
- SIES, H. (1996) Antioxidants in disease mechanisms and therapeutic strategies. *Academic Press.* San Diego.
- SIES, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215(2), 213-9.
- SIES, H.; STAHL, W. & SUNDQUIST, A. R. (1992). Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 669, 7–20.
- SLOVITER, R. S. (1985). A selective loss of hippocampal mossy fiber Timm stain accompanies granule cell seizure activity induced by perforant path stimulation. *Brain Res.* 330, 150–3.
- SONG, G.; OUYANG, G. & BAO, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 59-71.
- SONODA, Y.; WATANABE, S.; MATSUMOTO, Y.; AIZU-YOKOTA, E. & KASAHARA, T. (1999). FAK is the upstream signal protein of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt survival pathway in hydrogen peroxide-induced apoptosis of a human glioblastoma cell line. *J. Biol. Chem.* 274, 10566–70.
- SORDELLA, R.; BELL, D. W.; HABER, D. A. & SETTLEMAN, J. (2004). Gefitinib sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science.* 305, 1163–7.
- STAMLER, J. S. (1994). Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 78, 931–6.
- STEPHENS, L.; ANDERSON, K.; STOKOE, D.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; PAINTER, G. F.; HOLMES, A. B.; GAFFNEY, P. R.; REESE, C. B.; MCCORMICK, F.; TEMPST, P.; COADWELL, J. & HAWKINS, P. T. (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science.* 279, 710–4.
- SUH, S. W.; CHEN, J. W.; MOTAMEDI, M.; BELL, B.; LISTIAK, K.; PONS, N. F.; DANSCHER, G. & FREDERICKSON, C. J. (2000). Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res.* 852, 268–73.

- SUN, H. & TONKS, N. K. (1994). The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 19, 480–5.
- TAKEDA, A. (2004). Essential trace metals and brain function. *Pharmaceutical Society of Japan.* 124(9), 577-85.
- TAKEDA, A. (2000). Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res. Rev.* 34, 137–48.
- TANG, X. & SHAY, N. F. (2001). Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. *J. Nutr.* 131, 1414–20.
- TAPIERO, H. & TEW, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother.* 57, 399–411.
- THOMAS, C. C.; DEAK, M.; ALESSI, D. R. & VAN AALTEN, D. M. (2002). Highresolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr. Biol.* 12, 1256–62.
- TIETZE, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27(3), 502-22.
- VALLEE, B. L. & AULD, D. S. (1996). Active zinc binding sites of zinc metal-glutamate transporter. *Nature.* 383, 634–7.
- VALLEE, B. L. & FALCHUK, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73, 79–118.
- VALLEE, B. L. & FALCHUK, K. H. (1986). The biological basis of zinc physiology. *Neurosci.* 6, 2950–67.
- VAN DER HEIDE, L. P.; KAMAL, A.; ARTOLA, A.; GISPEN, W. H. & RAMAKERS, G. M. J. (2005). Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-D-aspartate receptor and phosphatidyl-inositol-3-kinase-dependent manner. *J. Neurochem.* 94, 1158–66.
- VOET, D.; VOET, J. G. & PRATT, C. W. (2000). *Fundamentos de Bioquímica.* Porto Alegre. Artmed Editora.
- VOGT, K.; MELLOR, J.; TONG, G. & NICOLL, R. (2000). The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron.* 26, 187–96.
- VOS, R. M. E. & VAN BLADEREN, P. J. (1990). Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* 75, 241-65.
- WAETZIG, V. & HERDEGEN, T. (2005). Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 26(9), 455-61.

- WALTHER, U. I.; CZERMAK, A.; MÜCKTER, H.; WALTHER, S. C. & FICHTL, B. (2003). Decreased GSSG reductase activity enhances cellular zinc toxicity in three human lung cell lines. *77*, 131–7.
- WANDRES, R. J. A. & DENIS, D. (1992). Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1115, 259–2.
- WANG, Z.; LI, J. Y.; DAHLSTROM, A. & DANSCHER, G. (2001). Zinc enriched GABAergic terminals in mouse spinal cord. *Brain Res.* 921, 165–72.
- WANG, X.; MCCULLOUGH, K. D.; FRANKE, T. F. & HOLBROOK, N. J. (2000). Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* 275, 14624–31.
- WEISS, J. H. & SENSI, S. L. (2000). Ca^{2+} - Zn^{2+} permeable AMPA or kainate receptors possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 23, 365–71.
- WEISS, J. H.; SENSI, S. L. & KOH, J. Y. (2000). A novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 395–401.
- WENDEL, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325–333.
- WICK, A.; WICK, W.; WALTENBERGER, J.; WELLER, M.; DICHGANS, J. & SCHULZ, J. B. (2002). Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J. Neurosci.* 22, 6401–7.
- WILHELM, B.; WALTHER, U. I. & FICHT, B. (2001). Effects of zinc chloride on glutathione and glutathione synthesis rates in various lung cell lines. *Arch Toxicol.* 75, 388–94.
- YANG, J.; CRON, P.; GOOD, V. M.; THOMPSON, V.; HEMMINGS, B. A. & BARFORD, D. (2002). Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat. Struct. Biol.* 9(12), 940–4.
- YAO, R. & COOPER, G. M. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science.* 267, 2003–6.
- YIN, H. Z.; HA, D. H.; CARRIEDO, S. G. & WEISS, J. H. (1998). Kainate-stimulated Zn^{2+} uptake labels cortical neurons with Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate channels. *Brain Res.* 781(1-2), 45–5.
- ZHANG, H. F.; ONG, W. Y.; LEONG, S. K. & LAPERCHE, Y. (1997). Species differences in the localization of gamma-glutamyl transpeptidase immunopositive cells at the blood–brain interface. *J. Brain Res.* 38, 323–30.
- ZHANG, J.; GRAHAM, D. G.; MONTINE, T. J. & HO, Y. S. (2000). Enhanced N-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity in mice deficient in CuZn superoxide dismutase or glutathione peroxidase. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 53–61.

ZHAO, H.; SHIMOHATA, T.; WANG, J. Q.; SUN, G.; SCHAAL, D. W.; SAPOLSKY, R. M. & STEINBERG, G. K. (2005). Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J. Neurosci.* 25(42), 9794-806.